

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

**Verlaufsuntersuchungen zum Vorkommen potentiell humanpathogener
Yersinia enterocolitica und *Campylobacter* spp.
in Schweinebeständen von der Geburt bis zur Schlachtung sowie
Genotypisierung ausgewählter Isolate**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Sandra Kasimir
aus Greiz

Leipzig, 2005

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Gotthold Gäbel
Betreuer: Professor Dr. Karsten Fehlhaber

Gutachter: Professor Dr. Karsten Fehlhaber
Institut für Lebensmittelhygiene der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Uwe Truyen
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Roger Stephan
Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
Universität Zürich

Tag der Verteidigung: 24.02.2005

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	2
2.1.1 Historischer Überblick	2
2.1.2 Taxonomie	2
2.1.3 Serovare	3
2.1.4 Eigenschaften	3
2.1.5 Epidemiologie	4
2.1.5.1 Geographische Verbreitung und Reservoir	4
2.1.5.2 Übertragungswege	4
2.1.6 Isolierung und Identifizierung	5
2.1.6.1 Isolierung	5
2.1.6.1.1 Anreicherungsverfahren	5
2.1.6.1.2 Selektivnährmedien	6
2.1.6.2 Identifizierung	7
2.1.7 Pathogenitätsfaktoren	7
2.1.7.1 Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren	7
2.1.7.2 Plasmid-kodierte Pathogenitätsfaktoren	9
2.1.8 Infektion mit <i>Yersinia enterocolitica</i> bei Mensch und Tier	10
2.1.8.1 Mensch	10
2.1.8.2 Schwein	12
2.1.8.3 Andere Tierarten	15
2.1.9. Lebensmittelhygienische Bedeutung	16
2.1.9.1 Fleisch und Fleischerzeugnisse sowie Fisch	16
2.1.9.2 Milch und Milchprodukte	17
2.1.9.3 Wasser	18
2.1.10 Möglichkeiten der Bekämpfung in Schweinebeständen	18
2.2 <i>Campylobacter</i>	19
2.2.1 Historischer Überblick	19
2.2.2 Taxonomie	19
2.2.3 Serovare	20
2.2.4 Eigenschaften	20
2.2.5 Epidemiologie	21
2.2.5.1 Geographische Verbreitung und Reservoir	21
2.2.5.2 Übertragungswege	21
2.2.6 Isolierung und Identifizierung	22
2.2.6.1 Isolierung	22
2.2.6.1.1 Anreicherungsverfahren	22
2.2.6.1.2 Selektivnährmedien	23
2.2.6.2 Identifizierung	24
2.2.7 Pathogenitätsfaktoren	24
2.2.8 Infektion mit <i>Campylobacter</i> spp. bei Mensch und Tier	26
2.2.8.1 Mensch	26
2.2.8.2 Schwein	28
2.2.8.3 Andere Tierarten	29
2.2.9 Lebensmittelhygienische Bedeutung	31
2.2.9.1 Fleisch und Fleischerzeugnisse sowie Fisch	31
2.2.9.2 Milch und Milchprodukte	32

2.2.9.3 Wasser	32
2.2.10 Möglichkeiten der Bekämpfung in Schweinebeständen	32
2.3 Genotypische Differenzierungsmethoden.....	34
2.3.1 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	34
2.3.2 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)	35
3 Material und Methoden.....	37
3.1 Material	37
3.1.1 Betriebe	37
3.1.2 Probennahme	40
3.1.2.1 Probennahme in den Betrieben	40
3.1.2.2 Probennahme auf dem Schlachthof.....	41
3.2 Methoden.....	42
3.2.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	42
3.2.1.1 Probenaufbereitung und Isolierung	42
3.2.1.2 Identifizierung	42
3.2.1.3 Weiterführende Untersuchungen.....	44
3.2.1.3.1 Serotypisierung.....	44
3.2.1.3.2 Biotypisierung	44
3.2.1.3.3 Nachweis der Pathogenität	45
3.2.1.4 Molekularbiologische Differenzierung von <i>Y. enterocolitica</i> mittels PFGE	46
3.2.2 <i>Campylobacter</i> spp.	47
3.2.2.1 Probenaufbereitung und Isolierung	47
3.2.2.2 Identifizierung	47
3.2.2.3 Molekularbiologische Differenzierung von <i>C. coli</i> mittels AFLP	49
3.2.3 Statistische Methoden	52
4 Ergebnisse.....	53
4.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	53
4.1.1 Vorkommen in den Zucht- und Mastbetrieben.....	53
4.1.1.1 Kotproben.....	53
4.1.1.2 Umgebungsproben	56
4.1.2 Vorkommen zum Schlachtzeitpunkt.....	56
4.1.2.1 Kot, Tonsillen, Lymphknoten und Oberflächentupferproben	56
4.1.2.2 Umgebungsproben	59
4.1.3 Prüfung der Pathogenität.....	60
4.1.4 Genotypisierung ausgewählter <i>Y. enterocolitica</i> -Isolate.....	61
4.2 <i>Campylobacter</i>	62
4.2.1 Vorkommen in den Zucht- und Mastbetrieben.....	62
4.2.1.1 Kotproben.....	62
4.2.1.2 Umgebungsproben	66
4.2.2 Vorkommen zum Schlachtzeitpunkt.....	66
4.2.2.1 Kot, Tonsillen, Lymphknoten und Oberflächentupferproben	66
4.2.2.2 Umgebungsproben	70
4.2.3 Genotypisierung ausgewählter <i>Campylobacter</i> -Isolate	71
4.2.3.1 Umgebungsproben	71
4.2.3.2 Proben auf dem Schlachthof.....	73

5 Diskussion	76
5.1 Vorkommen von <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 bei Schweinen	76
5.1.1 Kotproben in den Betrieben und auf dem Schlachthof	76
5.1.2 Tonsillen, Lymphknoten, Schlachtkörperoberfläche	78
5.1.3 Saisonalität	79
5.1.4 Infektionsquellen	80
5.1.5 Serotypen	81
5.1.6 Genotypisierung	82
5.1.7 Pathogenitätsprüfung	82
5.1.8 Schweinefleisch als Infektionsquelle für den Menschen	84
5.2 Vorkommen von <i>Campylobacter</i> spp. bei Schweinen	85
5.2.1 Kotproben in den Betrieben und auf dem Schlachthof	85
5.2.2 Tonsillen, Lymphknoten, Schlachtkörperoberfläche	87
5.2.3 Infektionsquellen	88
5.2.4 Genotypisierung	89
5.2.5 Schweinefleisch als Infektionsquelle für den Menschen	90
5.3 Schlußfolgerungen aus Sicht des Verbraucherschutzes.....	91
6 Zusammenfassung.....	93
7 Summary.....	95
8 Literaturverzeichnis.....	97
9 Lebenslauf.....	131
10 Anhang	132

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
<i>ail</i>	attachment invasion locus
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Campylobacter</i>
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCD-Kamera	Charge-Coupled Device-Kamera
CCUG	Culture Collection University of Göteborg
CE	competitive exclusion
CFU	Colony forming unit
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	EDTA-Natriumlaurylsarkosin-Puffer
ESP	EDTA-Natriumlaurylsarkosin mit Proteinase K
et al.	et alii
Fa.	Firma
g	Gramm
G	Guanin
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
h	Stunde(n)
i	Inosin
IfSG	Infektionsschutzgesetz
<i>inv</i>	Invasin
ISO	International Organisation for Standardisation, Genf, Schweiz
ITC	Irgasan-Ticarillin-Kaliumchlorat
LEP	Laboratory of Enteric Pathogens
LT	Lebenstag
LW	Lebenswoche
kb	Kilobasenpaare
kDa	kilo-Dalton
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharide
mb	Megabasenpaare
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mCCDA	modifizierter Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
n	Probenanzahl
NaCl	Natriumchlorid
NEB	New England Biolabs
NTC	no template control

Abkürzungsverzeichnis

n.u.	nicht untersucht
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pH	Pondus Hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIV	Trisbase-NaCl-Puffer
R	degenerative Base (Wobble) Adenin/Guanin
R+D	Reinigung und Desinfektion
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
sec	Sekunde
SPF	spezifisch pathogenfrei
spp.	Spezies
SSDC-Agar	modifizierter <i>Salmonella-Shigella</i> -Agar
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
TE	Trisbase mit EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Trypton Soja Agar
U	Units
UPGMA	Unweighted pair group using arithmetic averages
UV	Ultraviolett
VBNC	Viable but nonculturable
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
<i>yadA</i>	<i>Yersinia</i> adhesin A
<i>yop</i>	<i>Yersinia</i> outer membrane protein
Σ	Summe
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Einleitung

Die Infektionen mit *Yersinia enterocolitica* und *Campylobacter* spp. stellen weltweit häufige Ursachen bakterieller humaner Gastroenteritiden dar. Die Yersiniose ist in Deutschland nach der Campylobacteriose und der Salmonellose die dritthäufigste Ursache der bakteriellen Enteritis infectiosa. In einigen Ländern übersteigen die *Campylobacter*-Infektionen sogar die Salmonellose-Fälle. Besondere Bedeutung kommt hier vor allem den thermophilen Spezies *C. jejuni* und *C. coli* zu, welche am häufigsten von an Enteritis erkrankten Personen zu isolieren sind.

Y. enterocolitica ist neben *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* eine der drei humanpathogenen *Yersinia* Spezies. Hier ist das Bioserovar 4/O:3 von besonderer Bedeutung, da dieses die Hauptursache humaner Erkrankungen im europäischen Raum ist.

Die Infektionsquellen für *Campylobacter* spp. sind mannigfaltig. Unzureichend erhitztes Geflügelfleisch, Rohmilch, Trinkwasser und rohes Schweinefleisch sind als Ausgangspunkte für humane Infektionen anzusehen. Auch eine Übertragung von Mensch zu Mensch oder von Haustier zu Mensch ist möglich.

Des Weiteren wird rohes Schweinefleisch auch als Hauptinfektionsquelle für *Yersinia enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 angesehen, da Schweine häufig Träger dieses Bioserovars sind und als Reserviertiere für diesen Typ angesehen werden.

Da beide Infektionen beim Schwein in der Regel symptomlos verlaufen und somit weder im Bestand noch auf dem Schlachthof bei der Schlacht tier- und Fleischuntersuchung erkannt werden, ist es möglich, dass diese Zoonoseerreger in die Lebensmittelkette gelangen.

Beide Erkrankungen sind vor allem Kleinkinderkrankungen, bei der Campylobacteriose ist eine zweite Erkrankungshäufung im frühen Erwachsenenalter zu erkennen. Hauptsächlich äußern sich die Erkrankungen mit Durchfällen, aber auch schwerere oder klinisch inapparente Verläufe sind zu beobachten. Ebenso sind Folgeerkrankungen, wie beispielsweise das Erythema nodosum, möglich. Die Dunkelziffern dieser beiden Erkrankungen werden von Fachleuten wesentlich höher geschätzt, da oft nicht wegen einer Durchfallerkrankung ein Arzt aufgesucht und nicht in jedem Labor routinemäßig auf diese Erreger untersucht wird. Für beide Keime besteht seit Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes im Jahre 2001 Meldepflicht.

Ziel dieser Arbeit ist die Feststellung der Prävalenzen der beiden Erreger in Schweinemastbetrieben mit konventioneller und ökologischer Haltung sowie auf dem Schlachthof. Epidemiologische Fragen, wie Eintragsquellen und Verwandtschaften der Stämme untereinander, werden betrachtet. Dafür werden zwei molekularbiologische Fingerprintingmethoden (AFLP und PFGE) genutzt. Es soll der Frage nachgegangen werden, ob die beim Schwein vorkommenden *Yersinia enterocolitica*- und *Campylobacter*-Stämme in die Lebensmittelkette eingetragen werden und somit Ausgangspunkt für humane Infektionen sind.

2 Literaturübersicht

2.1 *Yersinia enterocolitica*

2.1.1 Historischer Überblick

1934 beschrieben MCIVER und PIKE (1934) in den Vereinigten Staaten von Amerika einen kleinen, gramnegativen Kokkobazillus, welcher aus zwei Gesichtsabszessen einer dreiundfünfzigjährigen Farmbewohnerin isoliert worden war, unter der Bezeichnung *Flavobacterium pseudomallei* Whitmore-ähnlich. Sie hielten es aber für wahrscheinlicher, es mit einer atypischen Form eines bereits bekannten Erregers zu tun zu haben als mit einer neuen Spezies.

Fünf Jahre später stellten zwei Mitarbeiter des New Yorker Gesundheitsamtes, SCHLEIFSTEIN und COLEMAN (1939), die diesen Erreger bereits 1934 erhalten hatten, eine Ähnlichkeit mit vier weiteren zu ihnen gelangten Isolaten fest. Sie bezeichneten die Bakterien als *Actinobacillus lignieresii*- und vor allem als *Pasteurella pseudotuberculosis*-ähnlich. Da sich die Eigenschaften dieser fünf Isolate von denen der beiden letztgenannten Spezies unterschieden und drei dieser Isolate aus dem Darminhalt stammten, schlugen sie den Namen *Bacterium enterocoliticum* vor.

2.1.2 Taxonomie

Das Genus *Yersinia* wurde im Jahre 1944 durch VanLoghem zu Ehren von Alexandre Yersin, welcher 1894 in Hongkong während einer Pestepidemie den Erreger der Pest (ehemals *Pasteurella pestis*, heute *Yersinia pestis*) entdeckte, begründet.

Im Jahre 1964 wurde das *Bacterium enterocoliticum* in *Yersinia (Y.) enterocolitica* umbenannt und in die Familie der *Enterobacteriaceae* eingegliedert (FREDRIKSEN 1964). Von 1976 an beschäftigten sich BRENNER et al. (1976) damit, DNA-Verwandtschaftsgruppen unter den wahren *Y. enterocolitica* und den „*Y. enterocolitica*-like“ Organismen zu beschreiben. Schließlich wurden 1980 vier *Yersinia*-Spezies etabliert: *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* und *Y. kristensinii* (BERCOVIER et al. 1980, BRENNER et al. 1980, URSING et al. 1980). Ein ausführlicher Überblick zu Geschichte und Taxonomie ist bei BOTTONE (1997) zu finden.

In der Spezies *Y. enterocolitica* sensu strictu wurden aufgrund biochemischer Unterschiede ursprünglich fünf Biotypen etabliert (NILÉHN 1969a). Dieses Schema wurde durch WAUTERS (1970) leicht verändert und vereinfacht. Einige Jahre später ergänzten BERCOVIER et al. (1978) den Biotyp 3 mit 3A und 3B, da er terrestrische Stämme isolierte, die diesem Biotyp ähnelten. Der ursprüngliche Biotyp 3 umfasste nur Isolate von Mensch und Tier.

Heute wird zumeist das überarbeitete Biotypisierungsschema nach WAUTERS et al. (1987) angewandt, welches die Biotypen 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5 unterscheidet. Für die ehemaligen Biotypen 3A und 3B wurde der Biotyp 6 vorgeschlagen, diese Bezeichnung hat sich aber nicht durchgesetzt. Seit 1988 existieren die

Speziesbezeichnungen *Y. mollaretii* und *Y. bercovieri* für die ehemaligen Biotypen 3A und 3B (WAUTERS et al. 1988a).

Die Gruppe der *Y. enterocolitica*-like Organismen wird durch *Y. aldovae* und *Y. rohdei* vervollständigt. Diese Bakterien wurden aus Wasser bzw. aus Human- und Hundekot sowie Oberflächenwasser isoliert (BERCOVIER et al. 1984, ALEKSIC et al. 1987).

Neben *Y. enterocolitica* gibt es zwei weitere humanpathogene Vertreter im Genus *Yersinia*: *Y. pestis*, der Erreger der Pest, und die mit ihr eng verwandte *Y. pseudotuberculosis*, welche beim Menschen enterale Infektionen mit Beteiligung mediastinaler Lymphknoten verursacht.

Der Erreger der Rotmalseuche der Salmoniden, *Y. ruckeri*, wird zur Zeit noch dem Genus *Yersinia* zugerechnet, obwohl nur eine geringe DNA-Homologie zu den anderen Vertretern dieser Gattung besteht (HEESEMANN 1994).

Durch NEUBAUER et al. (2000a) wurde aufgrund von DNA-Hybridisierungen und Sequenzierungen des 16S rRNA-Gens im Jahr 2000 eine Teilung der Spezies *Y. enterocolitica* in zwei Subspezies vorgeschlagen: *Y. enterocolitica* ssp. *enterocolitica* und *Y. enterocolitica* ssp. *palearctica*.

2.1.3 Serovare

Aufgrund verschiedener Antigene kann eine Einteilung in Serovare erfolgen. Diagnostische Bedeutung haben die O-Antigene (Oberflächenantigene) und die H-Antigene (Geißelantigene). Die O-Antigene werden mit Zahlen, die H-Antigene mit Buchstaben bezeichnet (SCHIEMANN 1989). Im Gegensatz zu den O-Antigenen, welche nicht speziesspezifisch sind, können die H-Antigene zur direkten Identifizierung herangezogen werden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Momentan sind mindestens 30 verschiedene O- und 18 verschiedene H-Antigene bekannt (ROBINS-BROWNE und HARTLAND 2003). Von den Oberflächenantigen-Serovaren sind in Europa vor allem die Serovare O:3, O:9 und O:5,27 von Bedeutung, in den USA ist das Serovar O:8 am häufigsten am Krankheitsgeschehen beteiligt (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Eine Zunahme der Infektionen mit O:3 ist aber in den letzten Jahren auch in den Vereinigten Staaten zu beobachten. Im Oktober 2001 trat in Deutschland erstmalig das Serovar O:8 bei einer Humanerkrankung auf (ANON. 2002a).

2.1.4 Eigenschaften

Y. enterocolitica ist ein gramnegatives, sporenloses, nicht selten kokkoides Stäbchenbakterium, welches sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen wächst. Aufgrund ihrer mono- bis peritrichen Begeißelung ist sie beweglich. Da die Motilität optimal bei Temperaturen von 22-28°C ausgebildet wird, nicht jedoch bei 37°C, wird sie als ein Differenzierungsmerkmal genutzt (HEESEMANN 1994). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Stämme des Biotyps 4 bei jeder Temperatur nur sehr schwach beweglich sind (NILÉHN 1969b).

Yersinien sind psychrotroph und können sich noch bei Temperaturen zwischen 0-4°C vermehren, was diagnostisch für die Kälteanreicherung von Bedeutung ist.

Zur Eisenversorgung stehen dem Erreger verschiedene Systeme zur Verfügung. Es kann sowohl Hämin als auch hydroxamat-gebundenes Eisen verwertet werden. Das für Mäuse hochpathogene Biovar 1B kann zudem noch Siderophoren produzieren, die als wichtiger Pathogenitätsfaktor und als Überlebensfaktor in der unbelebten Natur zu sehen sind (HEESEMAN 1994).

2.1.5 Epidemiologie

2.1.5.1 Geographische Verbreitung und Reservoirs

Y. enterocolitica tritt weltweit in den gemäßigten bis subtropischen Klimazonen (Nordamerika, Westküste Südamerikas, Europa, Nord-, Zentral- und Ostasien, Australien, Südafrika) auf. In den tropischen Gebieten Afrikas, Süd- und Südostasiens fehlt *Y. enterocolitica* weitgehend oder vollständig (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Der Erreger ist weit in der Umwelt verbreitet und konnte aus dem Darmtrakt vieler warmblütiger Tiere isoliert werden. Auch Vögel, Frösche, Fliegen, Fische, Flöhe, Krebse und Austern können *Y. enterocolitica* beherbergen (COVER und ABER 1989).

2.1.5.2 Übertragungswege

Die Infektion mit *Y. enterocolitica* wird meist als „food-borne“, also als eine durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel bedingte Erkrankung bezeichnet. Vor allem wird die Infektion in Zusammenhang mit der Aufnahme von rohem oder unzureichend erhitztem Schweinefleisch gebracht (TAUXE et al. 1987, FUKUSHIMA et al. 1989). Einen konkreten Hinweis auf das Schwein als Infektionsquelle gab eine belgische Studie. Bei 40 Personen, die an einer Yersiniose (36 mal Serovar O:3 und 4 mal Serovar O:9) erkrankt waren, wurden die Verzehrsgewohnheiten vor Erkrankungsbeginn analysiert. 32 der 40 Personen gaben an, binnen der beiden Wochen zuvor rohes Schweinefleisch gegessen zu haben. Bei einer Kontrollgruppe hingegen waren es nur 14 von 40 (TAUXE et al. 1987). Aber auch andere Lebensmittel und Milch können in Zusammenhang mit *Yersinia*-Infektionen gebracht werden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990).

Obwohl man bei Yersinien von einer relativ hohen mittleren Infektionsdosis ausgeht, scheint ebenso eine Übertragung von Haustieren auf den Mensch möglich zu sein. Vor allem der enge Kontakt zu Hunden und Katzen, die Träger des Bioserovars 4/O:3 sein können, kann eine potentielle humane Infektionsquelle darstellen (SCHIEMANN 1989, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b). Auch kommt der Mensch selbst als Infektionsquelle in Betracht, von Übertragungen von Patient zu Patient ist berichtet worden (BOTTONE 1997). Sehr selten kommt eine Infektion über kontaminierte Blutkonserven zustande. Da eine Vermehrung des Erregers noch bei Temperaturen zwischen 0-4°C erfolgt, können sich die Keime auch in ordnungsgemäß

gelagerten Blutkonserven anreichern. Eine in den USA durchgeführte Risikobewertung kam zu dem Ergebnis, dass die Häufigkeit eines Yersinien-assoziierten Transfusionszwischenfalls bei 1:500000 übertragener Erythrozytenkonzentrate liegt (ANON. 1999).

2.1.6 Isolierung und Identifizierung

2.1.6.1 Isolierung

Die Wahl der Isolierungsmethode ist abhängig vom Probenmaterial und dem Grad der Kontamination (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). In Stuhlproben von an Enteritis erkrankten Patienten ist der Erreger oft schon im Direktausstrich nachweisbar, bei symptomlosen Ausscheidern oder Rekonvaleszenten ist häufig das Voranstellen einer Anreicherung notwendig (PAI et al. 1979, VAN NOYEN et al. 1987b). Ebenso ist bei Lebensmittel- und Umweltpuben eine Anreicherung sinnvoll, da in solchen Proben meist nur eine geringe Zahl von pathogenen Yersinien, aber große Mengen an Begleitflora vorhanden sind (DE BOER 1992).

Für Yersinien gibt es keine amtliche Nachweismethode nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG).

2.1.6.1.1 Anreicherungsverfahren

In der Literatur ist eine Vielzahl verschiedener Anreicherungsmedien beschrieben, einen Überblick gibt Tabelle 1.

Tab. 1: Überblick über verschiedene Anreicherungsmedien

Anreicherungsmedium	Quelle
<u>I</u> rgasan- <u>T</u> icarcillin- <u>K</u> aliumchlorat-Bouillon (ITC)	WAUTERS et al. (1988b)
<u>M</u> odifizierte <u>R</u> appaport- <u>B</u> ouillon (MRB)	WAUTERS (1973)
Selenit-Bouillon	LEE et al. (1980)
<u>B</u> ile- <u>O</u> xalate- <u>S</u> orbose-Broth (BOS)	SCHIEMANN (1982)
<u>T</u> rypton- <u>S</u> oja- <u>B</u> ouillon (TSB)	FUKUSHIMA und GOMYODA (1986)

Die in Tabelle 1 aufgeführten Nährmedien werden in der Regel bei 22°C bis 37°C bebrütet. Aber es ist auch eine Kälteanreicherung möglich. Als Medium hierfür wird zumeist phosphatgepufferte Kochsalzlösung genutzt. Die Anreicherung wird bis zu drei Wochen bei 4°C inkubiert (PAI et al. 1979, DE BOER 1992). Häufig werden der Kochsalzlösung 1% Sorbitol und 0,15% Gallensalze zugesetzt (SCHIEMANN 1982, KONTNY und STEFFEN 1989). Da Yersinien alkalitoleranter als viele andere gramnegative Bakterien sind,

ist vor dem Ausstreichen eine Behandlung mit 0,25%-0,5%iger KOH-Lösung möglich, um die Begleitflora zu reduzieren (AULISIO et al. 1980).

2.1.6.1.2 Selektivnährmedien

Für die Isolierung von Yersinien wurden ursprünglich Nährmedien eingesetzt, die für andere enteropathogene Keime entwickelt worden waren, wie z.B. MacConkey-Agar, *Salmonella-Shigella*-Agar oder Desoxycholat-Citrat-Agar (DE BOER 1992). Auf diesen Medien wachsen die Yersinien aber nur langsam und können somit leicht von anderen Keimen überwuchert werden. Somit bestand die Notwendigkeit, die Nährböden zu modifizieren bzw. neue Selektivnährböden zu entwickeln (Tabelle 2).

Tab. 2: Überblick über verschiedene Selektivnährböden

Nährboden	Quelle
<u>C</u> efsulodin- <u>I</u> rgasan- <u>N</u> ovobiocin-Agar (CIN)	SCHIEMANN (1979)
<u>V</u> irulent <u>Y</u> ersinia <u>e</u> nterocolitica-Agar (VYE)	FUKUSHIMA (1987)
<u>S</u> almonella- <u>S</u> higella- <u>D</u> esoxycholat-Agar mit <u>C</u> aCl ₂ -Zusatz (SSDC)	WAUTERS (1973)
<u>C</u> ongored- <u>M</u> agnesium- <u>O</u> xalat-Agar (CRMox-Agar)	RILEY und TOMA (1989)
Cellobiose-Arginin-Lysin-Agar (CAL)	DUDLEY und SHOTTS (1979)
„Y“ Medium	SOLTESZ et al. (1980)

Heute hat sich für die Isolierung vor allem der CIN-Agar durchgesetzt. Vergleichsuntersuchungen zeigten, dass dieser Nährboden die stärkste Selektivität für *Yersinia*-Spezies besitzt (HEAD et al. 1982, COX und BAILEY 1990). Durch die Antibiotika Cefsulodin und Irgasan werden andere gramnegative Keime wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* gehemmt. Yersinien wachsen nach 24 bis 48 Stunden bei 28°C als ca. 1mm große Kolonien mit dunkelrotem Zentrum und klarem Hof, in der sogenannten „Kuhaugenmorphologie“. Der Nachweis wird allerdings dadurch erschwert, dass *Citrobacter*-, *Enterobacter*-, *Aeromonas*-, *Klebsiella*- und *Proteus*-Kolonien eine ähnliche Wachstumsform zeigen (DEVENISH und SCHIEMANN 1981, HARMON et al. 1983).

2.1.6.2 Identifizierung

Die Identifizierung ist mit Hilfe biochemischer Testsysteme wie dem API 20E, dem API Rapid 32 IDE (Fa. BioMerieux) und dem Micronautsystem möglich. Der API 20E wird als „Gold Standard“ angesehen (IZARD et al. 1984, OVERMAN et al. 1985). Dieser hat für *Y. enterocolitica* eine Sensitivität von 96% (NEUBAUER et al. 1998). Ein Nachweis kleinster Mengen Yersinien-DNA ist mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) möglich. Prinzip der PCR ist die Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Zielsequenz und deren anschließendes Sichtbarmachen mittels Gel-Elektrophorese. Es existieren viele verschiedene PCR-Protokolle, welche auf bestimmte Gene pathogener *Y. enterocolitica*-Isolate, wie z.B. *yadA*, *ail*, *virF*, *yst*, *inv* und *yopT* gerichtet sind (FENG et al. 1992, IBRAHIM et al. 1992, KAPPERUD et al. 1993, RASMUSSEN et al. 1995, ARNOLD et al. 2001).

Ein Nachweis der Pathogenität von Stämmen ist mittels verschiedener Tests möglich. Das Wachstum pathogener Yersinien ist bei 37°C calciumabhängig. Ebenso binden pathogene Isolate Kongorot. Diese beiden plasmidkodierten Eigenschaften können auf dem CRMÖX-Agar nachgewiesen werden. Plasmidtragende Stämme wachsen als kleine rote, plasmidlose hingegen als große farblose Kolonien (RILEY und TOMA 1989). Ein Hinweis auf die Pathogenität eines Stammes ist auch die Autoagglutination. Des Weiteren fallen bei pathogenen Yersinien die Salicinfermentation, die Aesculinhydrolyse und der Pyrazinaminidasenachweis negativ aus (FARMER et al. 1992). Auch die Serotypisierung kann einen Hinweis auf die Pathogenität geben. Kommerziell erhältliche O:3, O:5, O:8 und O:9 Antiseren werden häufig genutzt. Aber auch apathogene *Y. enterocolitica*-Isolate und andere Yersinien-Spezies können diese Antigene tragen (ALEKSIC 1995). Auch der Biotyp spielt eine Rolle. Isolate des Typs 1A sind zumeist apathogen.

2.1.7 Pathogenitätsfaktoren

Um eine volle Virulenz auszubilden, sind sowohl chromosomale als auch extrachromosomale (plasmid-kodierte) Pathogenitätsfaktoren notwendig (BOTTONE 1997).

2.1.7.1 Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren

Die Kolonisation des Darmtrakts setzt voraus, dass ein Bakterium am Darmepithel anhaften und die Epithelzellen penetrieren kann. Hierfür sind bei *Y. enterocolitica* zwei chromosomale Gene verantwortlich: das *inv* (invasin)-Gen und das *ail* (attachment invasion locus)-Gen (MILLER und FALKOW 1988).

Das *inv*-Gen kodiert für ein 103 kDa Außenmembranprotein, welches durch Anheftung an einen Rezeptor des B1 Integrins der M-Zellen die Zellpenetration initiiert (ISEBERG und LEONG 1990). Es wurde zuerst durch ISEBERG und FALKOW (1985) in *Y. pseudotuberculosis* nachgewiesen. Die Autoren transferierten das *inv*-Gen in nichtinvasive *Escherichia coli* K-12 Stämme, welche dadurch die Fähigkeit zur Zellinvasion

erlangten. Das *inv*-Gen ist zwar bei allen *Yersinia*-Spezies vorhanden, aber das Protein wird nur bei pathogenen Vertretern exprimiert (PIERSON und FALKOW 1990). Stämme, welchen das *inv*-Gen entfernt wurde, sind nicht in der Lage, die Peyerschen Platten zu kolonisieren, was in einem Mausmodell gezeigt werden konnte (PEPE und MILLER 1993).

Das *ail*-Gen kodiert für ein 17 kDa Außenmembranprotein. Das Protein Ail ermöglicht die Anheftung an und die Invasion in Epithelzellen. Des Weiteren vermittelt es die Fähigkeit der Serumresistenz (PIERSON und FALKOW 1993). Auch WACHTEL und MILLER (1995) bestätigten die Notwendigkeit des Ail-Proteins für die Serumresistenz und zeigten, dass diese Eigenschaft von der Wachstumsphase und von der Anzahl der Kopien des *ail*-Gens abhängig ist. So erfolgt eine maximale Genexpression in der stationären Phase, hingegen sind die Bakterien in frühen Wachstumsphasen serumsensitiv. Auch wird das Protein unter anaeroben Bedingungen geringer exprimiert (PEDERSON und PIERSON 1995). Ein weiterer Einflussfaktor auf die Expression ist die Temperatur. PEDERSON et al. (1997) zeigten, dass das Protein bei der Wirtstemperatur von 37°C, nicht aber bei 28°C gefunden werden kann. Das *ail*-Gen wurde bisher nur bei Serotypen nachgewiesen, welche mit klinischen Erkrankungen in Zusammenhang stehen (MILLER et al. 1989).

Ein weiteres Gen, welches für die Pathogenität von Bedeutung und chromosomal lokalisiert ist, ist das *yst*-Gen. Es kodiert für ein hitzestabiles Enterotoxin. Das Gen konnte von DELOR et al. (1990) bei keinem von 51 apathogenen, aber bei 89 von 89 pathogenen Isolaten nachgewiesen werden. Nach dem Transfer dieses Gens in *E. coli* K-12 Stämme waren diese in der Lage, das Toxin zu produzieren. Die Autoren fanden das Gen ebenso bei einzelnen *Y. kristensenii*-Stämmen. KWAGA et al. (1992) zeigten, dass das Gen auch vom Biovar 1A, von *Y. intermedia* und von anderen *Enterobacteriaceae* beherbergt werden kann. *Yst* wird am stärksten zu Beginn der stationären Phase exprimiert. Verschiedene Umweltfaktoren haben einen starken Einfluss auf die Expression. So wird z. B. im Trypticase-Soya-Medium das Toxin nur bei Temperaturen unter 30°C gebildet, was gegen eine Beteiligung am Krankheitsgeschehen spricht. Werden aber die Osmolarität und der pH-Wert auf ein Niveau angehoben, wie sie normalerweise im Ileum zu finden sind, erfolgt die Transkription des *yst*-Gens auch bei 37°C (MIKULSKIS et al. 1994).

Chromosomal kodiert ist ebenfalls das Lipopolysaccharid (LPS), welches einen Bestandteil der Oberfläche gramnegativer Bakterien darstellt. Das LPS besteht aus einem Oligosaccharidkern, dem Lipid A und O-Antigenen (Polysaccharidseitenketten). Kern und Lipid A stellen hoch konservierte Strukturen innerhalb eines Genus dar, die O-Antigene können beträchtlich variieren (JANSSON et al. 1981, ZAHNG et al. 1997). Auf dieser Variabilität der O-Antigene basiert die Serotypisierung (WAUTERS et al. 1991). Der Oligosaccharidkern besteht aus zwei Anteilen: einem inneren Kern in Form eines Heptasaccharids und einem äußeren Kern in Form eines Hexasaccharids (RADZIEJEWSKA-LEBRECHT et al. 1994). Dass der äußere Kern für die Virulenz von großer Bedeutung ist, wurde in einem Mausversuch gezeigt. Der Erreger tötete intragastrisch infizierte Mäuse, der Mutant ohne den äußeren Kern hingegen nicht (SKURNIK et al. 1999). Auch die Notwendigkeit der O-Seitenkette für die Virulenz des Serotyps O:3 wurde in einem Mausmodell bewiesen (AL-HENDY et al. 1992).

Eine Komplikation der Infektion mit gramnegativen Bakterien ist die reaktive Arthritis. Dass das LPS eine große Bedeutung als Arthritisauslöser hat, konnte schon an Ratten, Hasen und Hamstern gezeigt werden (NOYORI et al. 1994, OTTERNESS et al. 1994, IDOGAWA et al. 1998). Auch das Vorkommen von *Yersinia*-LPS in humaner Synovialflüssigkeit wurde demonstriert (WUORELA et al. 1999).

Ein weiterer chromosomaler Genkomplex ist *ure*, welcher für das Enzym Urease kodiert (DE KONING-WARD et al. 1994). Urease ist eine Hydrolase, die die Spaltung von Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid katalysiert und somit zu einem Anstieg des pH-Wertes führt. Dieser Anstieg des pH-Wertes trägt wahrscheinlich dazu bei, dass *Y. enterocolitica* nach oraler Aufnahme die Passage des sauren Magenmilieus nahezu unbeschadet übersteht (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE 1995). In einem Modell konnte gezeigt werden, dass die Urease eine Rolle für die Virulenz bei i.v. infizierten Ratten und oral infizierten Mäusen spielt (GRIPENBERG-LERCHE et al. 2000). Im Gegensatz hierzu ist die Urease von *Y. pseudotuberculosis* im Mausmodell nicht für die Virulenz erforderlich (RIOT et al. 1997).

2.1.7.2 Plasmid-kodierte Pathogenitätsfaktoren

Enteropathogene Yersinien (*Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*) tragen ein ca. 70 Kilobasen (kb) großes Virulenzplasmid, *Y. pestis* hingegen besitzt drei Plasmide von jeweils 10, 70 und 100 kb Größe. Der Verwandtschaftsgrad des 70-kb Plasmids der verschiedenen *Yersinia*-Arten beträgt 50-90% DNA-Sequenzhomologie (HEESEMANN 1994).

Dieses Virulenzplasmid, auch als pYV (plasmid for *Yersinia* virulence) bezeichnet, ist für die Ausbildung der vollen Virulenz unerlässlich (PORTNOY und MARTINEZ 1985). Es kodiert unter anderem für das Außenmembranprotein YadA (*Yersinia* adhesin A), für eine Vielzahl von sekretorischen Proteinen, die als Yops (*Yersinia* outer membrane protein) bezeichnet werden und für deren Sekretionsapparate, Ysc (Yop secretion) genannt.

Das kollagenbindende Außenmembranprotein YadA ist von entscheidender Bedeutung für die Enteropathogenität. Bei *Y. pestis* wird das *yadA*-Gen aufgrund einer Punktmutation nicht exprimiert, was erklären könnte, dass die Infektion mit diesem Erreger nicht zu einer Durchfallssymptomatik führt (HEESEMANN 1994). Eine Expression des Proteins erfolgt bei 37°C (DE ROUVROIT et al. 1992). Dass YadA von Bedeutung für die Adhäsion an der Bürstensaummembran ist, wurde am Kaninchendarm gezeigt (PAERREGAARD et al. 1991). Am menschlichen Darm wurde demonstriert, dass YadA die Bindung an die Submukosa vermittelt (SKURNIK et al. 1994). Ebenfalls ist es für die Vermittlung der Serumresistenz notwendig und leistet einen Beitrag zur Resistenz gegen Phagozytose (PILZ et al. 1992, RUCKDESCHEL et al. 1996). Auch die Autoagglutination ist von der YadA-Expression abhängig (SKURNIK et al. 1984).

Für mindestens 14 Yops kodieren die auf dem Plasmid lokalisierten *yop*-Gene (CHENG und SCHNEEWIND 1999). Diese Yops wurden ursprünglich als Außenmembranproteine beschrieben, da sie in der Außenmembranfraktion des Bakterienextraktes zuerst entdeckt wurden (PORTNOY et al. 1981). Heute werden sie als Sekretionsproteine bezeichnet, da sie auch im Überstand von Nährmedien zu finden sind

(MICHIELS et al. 1990). Yops werden bei 37°C und bei niedrigen Calciumgehalten im Kulturmedium synthetisiert (HEESEMAN et al. 1986, MICHIELS et al. 1990).

Die Funktion der Yops ist der Schutz vor Phagozytose. Dafür werden einige Yop-Typen, die sogenannten Effektor-Yops (YopE, YopH, YopM, YopN, YopO, YopP, YopT) über einen Typ III Sekretionsapparat (Ysc) in die eukaryotische Zelle eingeschleußt (MICHIELS et al. 1990, CORNELIS et al. 1998). Dieses Einschleusen erfolgt über ein Eiweißrohr, welches auch als Injektisom bezeichnet wird und etwa 70 nm aus der Bakterie herausragt. Andere, wie YopB, YopD und YopR, werden ins extrazelluläre Milieu abgegeben oder bleiben mit der Bakterienhülle in Verbindung (CHENG und SCHNEEWIND 2000). Wie essentiell YopH, YopE, YopO und YopT für den Schutz gegen Abwehrmechanismen der Wirtszelle sind, konnte in einem Versuch demonstriert werden, in welchem die Negativ-Mutanten, verglichen mit dem Wildtyp, signifikant stärker phagozytiert wurden (GROSDENT et al. 2002).

2.1.8 Infektion mit *Yersinia enterocolitica* bei Mensch und Tier

2.1.8.1 Mensch

Bei der Yersiniose des Menschen können verschiedene Verlaufsformen unterschieden werden: eine gastrointestinale und eine extraintestinale Verlaufsform sowie Folgeerkrankungen. Die Infektionsdosis beim Menschen wurde noch nicht genau bestimmt, aber es ist wahrscheinlich, dass sie 10^4 cfu überschreitet (ROBINS-BROWNE und HARTLAND 2003). In einem Infektionsversuch an einem Freiwilligen konnte gezeigt werden, dass eine Dosis von $3,5 \times 10^9$ cfu noch am selben Tag zu Durchfall führt (SZITA et al. 1973). Nach §7 IfSG, welches 2001 in Kraft trat, besteht eine Meldepflicht.

Gastrointestinale Verlaufsform

Nach einer Inkubationszeit von 3-10 (in der Regel 3-7) Tagen treten vor allem beim Kleinkind wässrige Durchfälle, Bauchschmerzen, Fieber, Übelkeit und Erbrechen sowie Kopfschmerzen und Entzündungen im Rachenbereich auf (TAUXE et al. 1987, COVER und ABER 1989, DEDIE et al. 1993).

Bei älteren Kindern und beim Erwachsenen sind die krampfartigen Bauchschmerzen besonders im Bereich der rechten Leistengegend lokalisiert. Da die Symptomatik somit auf eine Blinddarmentzündung hindeutet, wird die intestinale Yersiniose auch als Pseudoappendizitis bezeichnet (COVER und ABER 1989). Die Ursache dieser Schmerzen ist zumeist eine terminale Ileitis mit oder ohne mesenterialer Lymphadenitis (VAN NOYEN et al. 1991). Eine Enteritis tritt vor allem bei Kindern unter sechs Jahren auf, während bei Kindern über sechs Jahren schwerere und extraintestinale Verläufe das Krankheitsbild bestimmen (HOOGKAMP-KORSTANJE und STOLK-ENGELAAR 1995). Die Symptome klingen beim komplikationslosen Verlauf in der Regel nach einigen Tagen bis zwei, maximal vier Wochen ab (DEDIE et al. 1993).

Extraintestinaler Verlauf/ Folgeerkrankungen

Eine häufig beschriebene Folgeerkrankung der Yersiniose ist die reaktive Arthritis, welche durch eine nicht näher bekannte Immunreaktion ausgelöst wird. Rötung, Schwellung, Bewegungsbeeinträchtigung, Schmerzen und Fieber sind die Symptome dieser Erkrankung. Eine Disposition besteht bei Patienten mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA-B 27, welches bei 60-80% der Betroffenen nachweisbar ist (HOOGKAMP-KORSTANJE und DE KONING 1990). Eine ebenfalls auf immunologischen Prozessen beruhende Folgeerkrankung ist das Erythema nodosum. Es entwickelt sich bei ca. 10% der betroffenen Erwachsenen, vor allem bei Frauen (COVER und ABER 1989). Diese Erkrankung ist durch symmetrisch an den Unterschenkelstreckseiten, an Knie- und Fußgelenken, seltener an den Armen auftretende, unscharf begrenzte, bis 5 cm große druckschmerzhaftige Knoten gekennzeichnet und kann mit mäßigem Fieber, einem allgemeinen Krankheitsgefühl sowie Kopf- und Gliederschmerzen einhergehen (ANON. 1998). Auch das Reiter-Syndrom wird als postinfektiöse Komplikation beschrieben. Dieses ist durch die Trias Arthritis, Urethritis und Konjunktivitis gekennzeichnet. Auch hier besteht eine Disposition bei Patienten mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA-B 27 (ANON. 1998).

Ein septikämischer Verlauf der Infektion ist ebenfalls möglich. Dieser ist besonders bei älteren oder immungeschwächten Patienten zu beobachten. Disponierend für diesen Verlauf sind aber auch andere Grundkrankheiten wie Diabetes, Lungenentzündung oder Leberzirrhose (COVER und ABER 1989). Symptome dieser Verlaufsform sind wiederkehrendes oder kontinuierliches Fieber, starkes Unwohlsein mit Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost, Übelkeit mit Erbrechen und Gewichtsverlust (DEDIE et al. 1993). Zu dramatischen Verläufen kann es auch nach der Transfusion einer belasteten Blutkonserve kommen. Ein Endotoxinschock mit typischen Symptomen wie Kreislaufzusammenbruch, Fieber, Atemnot und disseminierter intravaskulärer Gerinnung kann die Folge sein. Ein tödlicher Ausgang aufgrund eines Multiorganversagens ist möglich (ANON. 1999b).

Als Folge einer *Y. enterocolitica*-Infektion sind auch Entzündungen der Pleura, der Gehirnhaut, des Auges, des Knochenmarks, der Schilddrüse, des Endokards, der Muskulatur, des Pankreas sowie der Gallenblase und des Rachens zu beobachten. Auch Aneurysmen und lokale Abszesse werden beschrieben (VAN NOYEN et al. 1987a, HOOGKAMP-KORSTANJE und DE KONING 1990).

Erkrankungszahlen

In Deutschland ist die Yersiniose nach der Salmonellose und der Campylobacteriose die dritthäufigste gemeldete Ursache der Enteritis infectiosa (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Einen Überblick über die Erkrankungszahlen gibt Tabelle 3. Die Dunkelziffer der Infektionen mit dem Erreger dürfte aber höher liegen, da die Krankheit vor allem bei Erwachsenen subklinisch verlaufen kann oder aufgrund einer leichteren Gastroenteritissymptomatik kein Arzt aufgesucht wird.

Tab. 3: Gemeldete Erkrankungen durch *Y. enterocolitica* in Deutschland und Sachsen

Jahr	Fälle in Deutschland		Fälle in Sachsen	
	absolut	pro 100000 EW	absolut	pro 100000 EW
1999	5321 ^{*.1}	11,8 ^{*.1}	799 ³	17,7 ³
2000	4778 ^{*.1}	10,7 ^{*.1}	871 ³	19,4 ³
2001	7186 ²	8,8 ²	835 ³	18,7 ³
2002	7515 ²	9,1 ²	886 ³	20,0 ³
2003	6571 ²	8,0 ²	870 ³	19,8 ³

EW Einwohner

*Daten aus nur 11 Bundesländern: Berlin, Brandenburg, Bremen, Hamburg, Hessen, Mecklenburg-Vorpommern, Nordrhein-Westfalen, Schleswig-Holstein, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen

¹ Daten gemäß deutschem Trendbericht Zoonosen (ANON. 2000a und 2001a)

² Daten gemäß Infektionsepidemiologischem Jahrbuch (ANON. 2002b, 2003a und 2004c)

³ Daten gemäß Landesuntersuchungsanstalt Sachsen (ANON. 2000b, 2001b, 2002c, 2003b und 2004d)

2.1.8.2 Schwein

In der Literatur wird das Schwein als Reservoirtier für *Y. enterocolitica* 4/O:3 beschrieben (BOTTONE 1997). Schon häufig konnten pathogene Yersinien aus Kotproben, aus Tonsillargewebe, von Zungen-, Rachenraum- und Oberflächentupfern sowie aus Innereien geschlachteter Schweine isoliert werden (ALDOVA und SVANDOVA 1984, FUKUSHIMA et al. 1990, FUNK et al. 1998, LETELLIER et al. 1999, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a, BUCHER 2001a). Zumeist sind die Betriebe in einem bestimmten Gebiet mit nur einem Bioserovar infiziert (FUKUSHIMA et al. 1990, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Seltener werden Mischinfektionen in einem Bestand beschrieben. So konnten NATTERMANN et al. (1985) aus einem Sauenbestand 6 Serovare aus Rektaltupferproben (O:6, O:10, O:5, O:8, O:18, O:3) isolieren. Hier erwies sich unerhitzt verfütterte Eibruchmasse als Infektionsquelle. Die Infektion des Schweines mit *Y. enterocolitica* verläuft in der Regel latent (NATTERMANN 1986a). Der Erreger kann aber auch beim Schwein eine klinische Symptomatik verursachen. So untersuchten NATTERMANN et al. (1985) in dem oben genannten Sauenbestand 70 verendete bzw. getötete Ferkel und Läufer. 15 Tiere zeigten pneumonische Veränderungen, 13 eine katarrhalische Enteritis, sieben eine Serositis und sechs eine Arthritis. Die bakteriologische Untersuchung ergab bei 30 Läufern das Vorliegen einer *Y.-enterocolitica*-Infektion. Ein weiterer pathogener Erreger konnte nur in vier Fällen nachgewiesen werden. Bei 16 Tieren wurden zwei, teilweise sogar drei Serovare gefunden.

BRÜGMANN et al. (2001) berichteten von der natürlichen Infektion eines American Minipig aus einer Hobbytierzucht mit dem Bioserovar 4/O:3. Das sechs Wochen alte Ferkel zeigte eine ausgeprägte Apathie, war inappetent und litt an bis zu 41°C hohem Fieber. Es verendete drei Tage nach dem Auftreten der ersten

klinischen Symptome. Pathomorphologische Veränderungen waren in Form einer diphtheroid-nekrotisierenden Ileitis und Thyphlokolitis zu beobachten. Diese Befunde stimmen mit den Befunden experimenteller oraler Infektion gnotobiotischer Saugferkel (ROBINS-BROWNE et al. 1985), normaler Saugferkel (SCHIEMANN 1988) und Läufer Schweine (ERWERTH und NATTERMANN 1987) mit dem Serovar O:3 überein.

Auch beim Schwein können wie beim Menschen im Zuge der Erkrankung Hautveränderungen auftreten. In einem Infektionsversuch sind sowohl flächige Durchblutungsstörungen vor allem im Bauchbereich als auch knötchenförmige Veränderungen an den Innenseiten der Extremitäten, die dem Erythema nodosum des Menschen ähneln, zu beobachten gewesen (NATTERMANN et al. 1986b). Des Weiteren wurde in diesem Versuch gezeigt, dass als Komplikationen ebenso Arthritiden, schwere Arthrosen und Epiphysiolysen auftreten können.

Der Erreger ist ebenfalls an Fruchtbarkeitsstörungen des Schweines beteiligt. So beschrieben die oben genannten Autoren einen Zusammenhang zwischen einer *Y.-enterocolitica*-Infektion und weiblichen Sexualhormonen. Bei weiblichen Schweinen traten die höchsten Antikörpertiter auf und durch Östrogengaben konnte der *Y.-enterocolitica*-Antikörperspiegel erhöht werden. Experimentell infizierte weibliche Schweine zeigten zum Teil azyklische und sehr stark ausgeprägte Rauscheerscheinungen. Aus Abortmaterial gelang der Erregernachweis bei sieben von 25 untersuchten Proben.

Die Verbreitung des Erregers in der frühen Phase der Infektion im Körper eines künstlich infizierten Schweines beschrieben THIBODEAU et al. (1999). Hierfür wurden Ferkel im Alter von fünf Wochen mit einer Dosis (3×10^8 cfu) *Y. enterocolitica* O:3 oral infiziert. Nach 30 Minuten, drei, sechs, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden jeweils fünf Tiere und ein negatives Kontrolltier euthanasiert. Schon nach 30 Minuten konnte der Erreger aus den Tonsillen und aus dem Kolon aller Ferkel isoliert werden. Bis zu drei Stunden nach der Infektion war eine Isolierung aus Leber oder Milz bei vier von zehn Tieren möglich. Im Ösophagus und im Darmkanal war der Erreger vor allem in den ersten 24 Stunden wiederzufinden. Die Tonsillen waren sowohl in den ersten 24 Stunden als auch danach häufig *Yersinia*-positiv. Die höchste Belastung mit acht positiven von zehn untersuchten Tieren war in diesem Organ ab 48 Stunden p.i. festzustellen. Auch wird beschrieben, dass die Ausscheidung des Erregers mit dem Kot nur über einen bestimmten Zeitraum nach der Infektion zu beobachten ist und eine Reinfektion der Tiere nicht gelingt (FUKUSHIMA et al. 1983, SCHIEMANN 1988, NIELSEN et al. 1996).

Verlaufsuntersuchungen vom Ferkel bis zum adulten Tier liegen bislang noch nicht vor, aber es ist bekannt, dass bei Sauen viel seltener *Y. enterocolitica* aus den Tonsillen zu isolieren ist. So untersuchten KORTE et al. (2004) Tonsillen von Mastschweinen und Sauen von sieben verschiedenen finnischen Schlachthöfen. Während bei den Mastschweinen 56% positiv waren, konnte bei den Sauenproben nur bei 14% der Erreger nachgewiesen werden.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über Isolierungsraten von *Y. enterocolitica* aus Kot und Tonsillen vom Schwein in Deutschland und Skandinavien.

Tab. 4: Nachweis von *Y. enterocolitica*-Stämmen aus Tonsillen und Faecesproben vom Schwein in Deutschland und Skandinavien (modifiziert nach BÜLTE et al. 1991)

Tonsillen										
Land	Proben	positiv		pathogene Serovare						Autor(en)
		O:3	O:5,27	O:8	O:9	Σ				
	n	n	%					n	%	
D	55	10	18,2	-	-	-	10	10	18,2	BOCKEMÜHL und ROTH (1978)
	180	15	8,3	-	-	-	11	11	6,1	HAWARI et al. (1981)
	115	33	28,7	24	-	-	9	33	28,7	WEBER und LEMBKE (1981)
	480	45	9,3	36	-	-	9	45	9,3	WEBER und KNAPP (1981)
	232	41	17,7	33	-	-	8	41	17,7	WEBER et al. (1983)
	103	14	13,6	10	-	-	4	14	13,6	STENGEL (1983)
	30	19	65	19	-	-	-	19	65	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2000)
	50	30	60	30	-	-	-	30	60	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001a)
N	47	28	59,6	28	-	-	-	28	59,6	NESBAKKEN (1985)
	461	191	41,4	146	1	-	-	147	31,9	NESBAKKEN und KAPPERUD (1985)
	5	3	60	3	-	-	-	3	60	NESBAKKEN (1988)
	200	160	80	1	-	-	-	1	0,5	KAPPERUD (1990)
DK	282	84	30	84	-	-	-	84	30	PEDERSEN und WINBLAD (1979)
	1122	230	20,5	230	-	-	-	230	20,5	CHRISTENSEN (1987)

Faecesproben										
Land	Proben	positiv		pathogene Serovare						Autor(en)
		O:3	O:5,27	O:8	O:9	Σ				
	n	n	%					n	%	
D	117	6	5,1	-	-	-	6	6	5,1	BOCKEMÜHL und ROTH (1978)
	1358	371	27,3	17	-	-	9	26	1,9	BOCKEMÜHL et al. (1979)
	631	24	3,8	23	-	-	1	24	3,8	WEBER und LEMBKE (1981)
	170	9	5,3	-	-	-	5	5	2,9	HAWARI et al. (1981)
	880	1	0,1	1	-	-	-	1	0,1	STOLL (1981)
	310	11	3,5	10	-	-	1	11	3,5	WUTHE et al. (1982)
	730	163	22,3	5	-	19	-	24	3,3	NATTERMANN et al. (1985)
	50	5	10	5	-	-	-	5	10	FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001a)
DK	322	29	9	7	-	-	-	7	2,2	PEDERSEN (1976)
	799	83	10,4	32	-	-	-	32	4	PEDERSEN und WINBLAD (1979)
FIN	205	1	0,5	1	-	-	-	1	0,5	AHVONEN et al. (1973)
	147	6	17,7	6	-	-	-	6	17,7	ASPLUND et al. (1990)
S	854	18	2,1	18	-	-	-	18	2,1	HURVELL et al. (1979)

n	Anzahl Proben	D	Deutschland	FIN	Finnland	S	Schweden
Σ	Summe	DK	Dänemark	N	Norwegen		

2.1.8.3 Andere Tierarten

Rind:

Pathogene *Y. enterocolitica* des Serovars O:9, Biotyp 2 oder 3 sowie das Bioserovar 4/O:3 konnten schon aus dem Kot von Rindern isoliert werden (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1996). Auch bei dieser Tierart scheinen Yersinien ursächlich an Aborten beteiligt zu sein. So konnten NATTERMANN et al. (1986b) den Erreger in 77 von 703 (11%) untersuchten Aborten nachweisen. Ebenso gelang ihnen die Isolierung des Serovars O:6 aus dem Sprunggelenk eines Mastbullens. Auch Mastitis und mesenteriale Lymphadenitis wurden als seltene Komplikationen beobachtet (MOLLARET et al. 1979). In der DDR lag die Seroprävalenz bei 53,1% (NATTERMANN et al. 1986b), in Belgien und Frankreich sind etwa 10% der Bestände serologisch positiv (WEYNANTS et al. 1996). Aktuelle Zahlen aus Deutschland sind zur Zeit nicht verfügbar. BUCHER et al. (2001b) untersuchten am Schlachthof München Kot- und Tonsillenproben von 101 Rindern, konnten dabei aber keine pathogenen Yersinien isolieren.

Hund:

Dem Hund wird eine Vektorrolle für die Übertragung zwischen der Umwelt mit freilebenden Nagern und den Haushalten zugeschrieben. Ebenso wie beim Menschen wird als Infektionsquelle rohes oder unzureichend erhitztes Schweinefleisch angesehen. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass zumeist das Bioserovar 4/O:3 isoliert wird (CHRISTENSEN 1987, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b). Meistens scheint eine Infektion des Hundes asymptomatisch zu verlaufen, aber auch abdominale Zysten, blutig-schleimiger Durchfall, Infektionen der Analdrüsen und mesenteriale Adenitis werden beschrieben. Eine gegenseitige Infektion der Hunde erfolgt durch deren Sozialverhalten (NEUBAUER et al. 2001a). Die Nachweisquote für *Yersinia enterocolitica* im Hundekot lag bei einer Studie aus dem Jahr 1980 bei 1% (JENTZEN und HELLMANN 1980).

Katze:

Ähnlich wie beim Hund wird auch die Katze als möglicher Vektor für humanpathogene Yersinien betrachtet (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001b). WEBER und LEMBKE (1981) untersuchten 252 zufällig ausgewählte Katzenkotproben, der Nachweis von *Y. enterocolitica* gelang nur in zwei Fällen. Die Isolate gehörten dem Serovar O:3 an. Da die verfügbaren Daten unzureichend sind, werden weiterführende Datenerhebungen dringend benötigt (NEUBAUER et al. 2001a).

Schaf und Ziege:

Vorwiegend ist in Europa bei kleinen Wiederkäuern der pathogene *Y. enterocolitica*-Typ Serovar O:2a,2b,3b,c Biotyp 5 zu finden (NEUBAUER et al. 2001a). Aber auch das Bioserovar 4/O:3 konnte vereinzelt nachgewiesen werden. So fanden LUDS und WEISS (1984) dieses Bioserovar in 2 von 293 (0,68%) untersuchten Schafkotproben. Klinische Ausbrüche wurden in Deutschland nur selten dokumentiert (WUTHE und ALEKSIC 1997). Eine Erkrankung tritt zumeist bei Lämmern auf und geht mit Durchfall, schlechtem Allgemeinbefinden und Abmagerung einher (SLEE und BUTTON 1990). Eine Infektion steht im allgemeinen in einem zeitlichen Zusammenhang mit Stressfaktoren wie Futterumstellung, Scheren,

Absetzen, feuchtem Klima und Transport (SLEE und BUTTON 1990, SLEE und SKILBECK 1992, BINKUN et al. 1994). Auch wurde beschrieben, dass eine Infektion von tragenden Schafen mit dem Serovar O:6,30, Biotyp 1A, welcher bei Laboruntersuchungen keine Pathogenitätsmarker aufwies, zur Plazentitis, zu Totgeburten oder zur Geburt lebensschwacher Lämmer führte (CORBEL et al. 1992).

Hase und Kaninchen:

Der bei Hasen und Kaninchen vorherrschende *Y. enterocolitica*-Typ ist ebenso das Bioserovar 5/O:2a,2b,3b,c, der sogenannte „Hasentyp“ (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Das pathomorphologische Bild entspricht dem der Pseudotuberkulose oder Rodentiose, welche durch *Y. pseudotuberculosis* verursacht wird und mit 10% aller Todesfälle wesentlich häufiger vorkommt (WUTHE et al. 1995). Die Tiere zeigen häufig Enterokolitiden, fibrinöse Serositiden, sowie Schwellungen von Lymphknoten, Leber und Milz (WUTHE und ALEKSIC 1997).

Pferd:

Dass *Y. enterocolitica* bei Fohlen zu finden ist, belegt eine Studie aus dem Vereinigten Königreich. Prävalenzunterschiede zwischen gesunden Fohlen und Fohlen mit Durchfall konnten jedoch nicht festgestellt werden (BROWNING et al. 1991). Ein Erkrankungsfall wurde in Japan im Jahre 2001 durch KATAYAMA et al. (2001) beschrieben. Eine vierjährige Vollblutstute verstarb an einer Peritonitis nach einem Darmdurchbruch. Dieser wiederum wurde durch ein Yersiniengranulom, aus welchem das Serovar O:3 isoliert werden konnte, verursacht. Auch beim Pferd scheint der Erreger an Aborten beteiligt zu sein. NATTERMANN et al. (1986b) konnten *Y. enterocolitica* bei drei von neun abortierten Fohlen nachweisen.

Chinchilla:

Infektionen mit dem Serovar O:1,2a,3 Biovar 3 wurden in verschiedenen Ländern Europas beschrieben. In Zuchten hält sich der Erreger wahrscheinlich subklinisch über Jahre. Auch hier kann das klinische Bild, bei welchem zahlreiche Granulome in inneren Organen typisch sind, mit dem der Rodentiose (*Y. pseudotuberculosis*) verwechselt werden (NEUBAUER 2001a).

Nutzgeflügel:

Zur Klinik und Epizootiologie beim Nutzgeflügel fehlen detaillierte Untersuchungen. Humanpathogene Yersinien des Serovars O:3 und O:9 konnten aber schon aus zur Sektion gelangten Hühnern nachgewiesen werden (NATTERMANN et al. 1986b). Aus Eibruchmasse konnten NATTERMANN et al. (1985) sechs Serovare isolieren. Die Rolle des Nutzgeflügels als Infektionsquelle ist in Zukunft noch genauer abzuklären (NEUBAUER et al. 2001a).

2.1.9. Lebensmittelhygienische Bedeutung

2.1.9.1 Fleisch und Fleischerzeugnisse sowie Fisch

Da Schweine häufig Träger humanpathogener Yersinien sind, wurden rohes Schweinefleisch und Schweinefleischprodukte bereits umfangreich auf den Erreger untersucht (SCHIEMANN 1980, DE BOER

und NOUWS 1991, KARIB und SEEGER 1994, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999a und 2001c). Aus Hackfleisch konnten ARNOLD et al. (2004) den Erreger bei 0,5%, DE BOER und NOUWS (1991) bei 1% und FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999a, 2001a) bei 2% bzw. 12% der untersuchten Proben nachweisen. Mittels PCR gelang der letztgenannten Autorin der Nachweis des *yadA*-Gens sogar in 25% der Proben. Viel höhere Isolationsraten als aus Schweinefleisch gelang aus Tonsillen, Zungen und Innereien vom Schwein (BÜLTE 1991, KARIB und SEEGER 1994, FREDRIKSSON-AHOMAA 2001a). Frische Rohwurst wurde von KLEEMANN und BERGANN (1994) auf das Vorkommen von *Yersinia* spp. untersucht. Aus 202 untersuchten Proben konnten sie 27 mal *Yersinia* spp. isolieren. 21 Isolate wurden als *Y. enterocolitica* identifiziert, aber keines gehörte den als pathogen geltenden Bioserovaren an. Allerdings konnte bei über 50% der Stämme ein Virulenzplasmid nachgewiesen werden, so dass unter diesen mit potentiell krank machenden Stämmen gerechnet werden muß. Einen weiteren Hinweis auf unzureichend erhitzte Schweinefleischprodukte und Würste als Infektionsquelle gibt eine in Norwegen durchgeführte Studie. Erkrankte Patienten gaben an, dass sie, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe, in den letzten beiden Wochen vor Krankheitsbeginn mehr Schweinefleisch und Würstchen zu sich genommen haben. Außerdem wurde nicht durchgebratenes Schweinefleisch von der erkrankten Gruppe bevorzugt (OSTROFF et al. 1994). Ebenfalls liegen Untersuchungen von Schinken und Salami vor, in 1% (1 von 100 Proben) bzw. in 1,3% (2 von 150 Proben) konnte das Bioserovar 2/O:9 nachgewiesen werden. Allerdings fielen die Virulenztests negativ aus (VELAZQUEZ et al. 1993).

Auch aus rohem Rindfleisch konnte der Erreger isoliert werden. Dabei wurden sowohl pathogene (FUKUSHIMA et al. 1997) als auch apathogene Stämme (KARIB und SEEGER 1994) gefunden. Das Bioserovar 4/O:3 wurde auch einmalig in Hasenfleisch nachgewiesen (KARIB und SEEGER 1994). Eine Isolation pathogener Yersinien aus Geflügelfleisch (COX et al. 1989, KHALAFALLA 1990), aus Schaf- oder Pferdefleisch (KARIB und SEEGER 1994) oder aus Fischen (LÖTSCH 1986, PULLELA et al. 1998, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001c) gelang bislang nicht.

2.1.9.2 Milch und Milchprodukte

Bei Untersuchungen von pasteurisierter Milch und Rohmilch konnten zumeist keine pathogenen Yersinien nachgewiesen werden (REA et al. 1992, ROHRBACH et al. 1992, SAUER 1996). Es werden aber auch Krankheitsausbrüche beschrieben, die mit dem Verzehr von Milch in Zusammenhang gebracht werden (BLACK et al. 1978, TACKET et al. 1984, ACKERS et al. 2000). Als Ursache ist eine Kontamination mit Faeces von Schwein oder Mensch während oder nach der Verarbeitung denkbar (SCHIEMANN 1987). Auch wenn Milchkühe nicht als Reservoir für pathogene Yersinien gelten, konnten JAYARAO und HENNING (2001) aus 131 Tankmilchproben acht *Y. enterocolitica*-Stämme isolieren, welche aufgrund des positiven Autoagglutinationstests als potentiell pathogen einzustufen waren.

2.1.9.3 Wasser

Wasser wird ebenso als mögliche Infektionsquelle für *Y. enterocolitica* angesehen. Der Erreger bleibt im Wasser bis zu mehreren Monaten lebens- bzw. vermehrungsfähig (NEILSON 1980). Eine Kontamination des Oberflächenwassers erfolgt wahrscheinlich über tierische Ausscheider wie Vögel, Nager und Kleinwild (STENGEL 1986). Auch eine Verunreinigung durch Gülle ist sehr wahrscheinlich. Durch STENGEL (1986) wurden 480 Brunnen- und Oberflächenwasserproben im Berliner Raum untersucht, aber in keiner konnte der Erreger nachgewiesen werden. Bei älteren Untersuchungen wurde *Y. enterocolitica* deutlich häufiger isoliert (HARVEY et al. 1976, SCHIEMANN 1978, BARTLEY et al. 1982). Allerdings erweisen sich die Stämme nach der heutigen Taxonomie vielmehr als *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* und *Y. kristensenii* (STENGEL 1986). Die bereits unter 2.1.8.1 erwähnte norwegische Studie deutet aber darauf hin, dass das Wasser als Infektionsquelle eine Rolle spielt. Verglichen mit der Kontrollgruppe konsumierte die erkrankte Gruppe häufiger unbehandeltes Wasser (OSTROFF et al. 1994).

2.1.10 Möglichkeiten der Bekämpfung in Schweinebeständen

Eine ca. einjährige Studie über Risikofaktoren in der Schweineproduktion wurde in Norwegen durchgeführt (SKJERVE et al. 1998). Diese zeigte, dass Herden mit reiner Masttierhaltung deutlich stärker belastet sind als Herden mit Aufzucht und Mast. Es ist davon auszugehen, dass der Zukauf von Tieren und die damit verbundene Durchmischung von Herden die größten Risiken für die Verbreitung des Erregers darstellen. Ebenso erhöhte der Zugang von Katzen und das Einstreuen mit Stroh das Risiko. Eine Verminderung des Erregereintrags konnte durch Unterdruckbelüftung, durch Hygienemaßnahmen wie das Nutzen von Desinfektionsmatten im Eingangsbereich und durch Fütterung per Hand erreicht werden. Ist aber der Erreger einmal im Bestand, scheint er zu persistieren. Es ist nicht genau bekannt, wie Sanierungsmaßnahmen den Yersinienstatus beeinflussen. Das Eliminieren von Trägartieren innerhalb der Herden hat sich bis jetzt als nicht effizient erwiesen (SKJERVE et al. 1998).

Im Jahre 2001 wurde in der Schweiz eine Studie zum Vorkommen von Zoonoseerregern in Schweinebeständen mit verschiedenen Haltungsformen durchgeführt. Der Einsatz von Medizinalfutter als Einstellungsprophylaxe stellte sich hierbei als Risikofaktor für das Auftreten von *Y. enterocolitica* im Bestand heraus (LEDERGERBER et al. 2003).

Eine Vakzination gegen den Erreger wurde an Labortieren bereits erfolgreich durchgeführt (NOLL und AUTENRIETH 1996, DI GENARO et al. 1998), konnte sich in der Praxis aber noch nicht durchsetzen. NATTERMANN et al. (1990) testeten in einem Schweinezuchtbestand, in welchem der Erreger weit verbreitet war, eine stallspezifische Adsorbatvakzine. Für die Wirksamkeit des Impfstoffes sprachen die bakteriologischen und serologischen Untersuchungsergebnisse sowie die Verbesserung der Fruchtbarkeitsleistung der Sauen.

Aufgrund der Gefährdung der menschlichen Gesundheit und aus betriebswirtschaftlichen Zwängen ist eine Bekämpfung des Erregers in Beständen mit hohen Prävalenzen zwingend notwendig (NATTERMANN et al.

1990). Wegen der weiten Verbreitung des Erregers und aufgrund dessen, dass Schweine über lange Zeiten gesunde Träger sein können, scheint eine Bekämpfung in den Beständen nur sehr schwer machbar zu sein (NESBAKKEN und SKJERVE 1996). Konkrete Regelungen hierfür gibt es nicht, aber das Vermeiden des Zusammenbringens von Schweinen verschiedener Herkunft in gemeinsame Mastställe, das Anwenden von Vakzinen in Problembeständen und die konsequente Einhaltung hygienischer Maßnahmen scheinen Schritte in die richtige Richtung zu sein.

2.2 *Campylobacter*

2.2.1 Historischer Überblick

1886 beschrieb der Kinderarzt Theodor Escherich spiralig gewundene Bakterien in der Kolonschleimhaut von an „Cholera infantum“ verstorbenen Kindern, konnte den Erreger aber nicht kultivieren. Da dieser Erreger auch von an Durchfall erkrankten Katzen isoliert werden konnte, wurde er als *Vibrio felinus* bezeichnet (ESCHERICH 1886). Von ähnlichen Erregern berichteten MCFADYEAN und STOCKMAN (1913) bei abortierten Schaflämmern. 1919 wurden diese Bakterien auch bei abortierten Rinderfeten nachgewiesen und als *Vibrio fetus* bezeichnet (SMITH und TAYLOR 1919). JONES et al. (1931) fanden Vibrionen bei an Winterdysenterie erkrankten Kälbern und nannten sie *Vibrio jejuni*, da er *Vibrio fetus* sehr ähnlich war, aber andere Antigeneigenschaften aufwies. Microaerophile *Vibrio coli* (heute *Serpulina hyodysenteriae*) wurden einige Jahre später aus dem Darm dysenteritischer Schweine isoliert (DOYLE 1944). KING (1957) fand 1957 zwei Gruppen von Vibrionen in Blutkulturen von Patienten, die an einer hämorrhagischen Darmentzündung erkrankt waren. Die eine Gruppe war *Vibrio fetus* sehr ähnlich, die andere Gruppe beschrieb sie als „related Vibrios“. SEBALD und VERON (1963) stellten fest, dass sich die DNA dieser beiden Gruppen von der DNA der Gattung *Vibrio* im Guanin- und Cytosinegehalt unterschied. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde diesen neuen Spezies der Genusname *Campylobacter*, der aus dem Griechischen kommt und gebogener Stab bedeutet, gegeben. Die ersten Isolierungen aus Stuhlproben von an Durchfall erkrankten Patienten gelangen Anfang der siebziger Jahre (DEKEYSER et al. 1972, BUTZLER et al. 1973).

2.2.2 Taxonomie

Die Familie der *Campylobacteraceae* umfasst heute vier Genera: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* und *Thiovulum* (GARRITY et al. 2001). Zum Genus *Campylobacter* gehören heute 16 Spezies und sechs Subspezies (ON 2001), 12 davon stehen in einer Beziehung zu Humanerkrankungen. Die humanpathogenen *Campylobacter* kann man in zwei Hauptgruppen einteilen: in die Durchfallerreger (z.B.

Campylobacter [*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*) und in die Erreger extraintestinaler Infektionen (z.B. *C. fetus*) (HU und KOPECKO 2003).

2.2.3 Serovare

Grundsätzlich werden zwei Serotypisierungsschemen für *C. jejuni/C. coli* unterschieden. Das Penner-Schema basiert auf hitzestabilen Oberflächen-Polysaccharid-Antigenen und unterscheidet ca. 65 Serotypen (PENNER und HENNESSY 1980). 160 Serogruppen werden im Lior-Schema unterschieden, welches hitzelabile Oberflächen- und Flagellen-Antigene zur Grundlage hat (LIOR et al. 1982). Das Penner-Schema und seine modifizierte Form, das LEP-Schema, werden häufiger angewendet (NEWELL 2000). Die Serotypisierung hat aber mehrere Nachteile: zum einen treten Kreuzreaktionen zwischen Antiseren auf (PRESTON und PENNER 1989), und einige Stämme sind nicht typisierbar oder infolge von Antigenvariationen instabil (HARRIS et al. 1987), zum anderen sind Antiseren nicht kommerziell erhältlich.

2.2.4 Eigenschaften

Campylobacter sind 0,5 bis 5µm lange, schlanke, gebogene bis spiralig gewundene, gramnegative, nicht sporenbildende Stäbchen. Aufgrund ihrer uni- oder bipolaren monotrichen Begeißelung zeigen sie eine lebhaft korkenzieherartige Beweglichkeit. Diagnostisch ist das mikroaerobe Wachstum (ca. 5% Sauerstoffgehalt) von Bedeutung (KIST 1994). Das Wachstumsoptimum thermophiler *Campylobacter*-Spezies (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis*) liegt bei 42°C, das der übrigen bei 37°C. Unter 30°C ist keine Vermehrung möglich (PARK 2002). Bei Temperaturen zwischen 15-22°C kann er sich in Trinkwasser und Lebensmitteln nur wenige Tage halten. Im gekühlten (+4°C) oder im gefrorenen (-20°C) Zustand ist dieser Zoonoseerreger in der Lage, mehrere Wochen zu überdauern (FEHLHABER 1992). Gegenüber Austrocknung ist er sehr sensibel und kann auf trockenen Oberflächen nur schwer überleben (FERNANDEZ et al. 1985, FEHLHABER 1992). *Campylobacter* ist nicht in der Lage, Siderophoren zu produzieren, kann aber exogene Siderophoren für seine Eisenversorgung binden (FIELD et al. 1986). Da sich *Campylobacter*-Spezies biochemisch inert verhalten, wird die Speziesunterscheidung erschwert. *C. jejuni* und *C. coli* sind biochemisch nur anhand der Hippurathydrolyse zu differenzieren.

Eine Besonderheit zeigen *Campylobacter*-Keime insofern, dass sie einen Zustand annehmen können, in welchem sie lebensfähig aber nicht kultivierbar sind. Dieses viable-but-nonculturable-Stadium (VBNC) können auch andere humanpathogene Erreger wie z. B. *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Vibrio cholerae* und *Legionella pneumophila* annehmen (THOLOZAN et al. 1999). Ob ein *Campylobacter*-Stamm in die VBNC-Form übergehen kann, hängt vom Stamm ab. Ein großer Teil (33 von 36 Stämmen) war in einem Versuch dazu nicht in der Lage (THOLOZAN et al. 1999). Unterschiedliche Meinungen zu dem

VBNC gibt es insofern, als dass einige Autoren davon ausgehen, dass es sich hierbei um eine degenerative Form handelt, andere es für eine Ruheform, die unter günstigen Bedingungen wieder wachsen kann, halten.

2.2.5 Epidemiologie

2.2.5.1 Geographische Verbreitung und Reservoir

Der Erreger ist weltweit verbreitet. Oft ist er als Kommensale im Darmtrakt von domestizierten Tieren und Wildtieren zu finden. Eine Infektion der Tiere erfolgt zumeist im sehr jungen Alter und führt zu einer lebenslangen Persistenz (HU und KOPECKO 2003). Viele Vögel, auch Zugvögel wie Enten, Gänse, Kraniche und Seemöwen, sind häufig Träger von *C. jejuni*. Ebenso werden *Campylobacter*-Spezies oft bei Nagetieren gefunden. Auch können Fliegen und Käfer den Erreger auf ihrem Exoskelett tragen (ALTEKRUSE und SWERDLOW 2002). Oberflächenwasser ist häufig mit *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* kontaminiert (ROSEF et al. 2001, HORMAN et al. 2004).

2.2.5.2 Übertragungswege

Geflügelfleisch und -produkte, die unzureichend erhitzt oder rekontaminiert wurden, stellen die Hauptinfektionsquelle für den Menschen dar (ANON. 1999a, CORRY und ATABAY 2001). Ausbrüche, die im Zusammenhang mit Geflügelfleisch standen, konnten mehrfach beobachtet werden (DEMING et al. 1987, PEARSON et al. 2000, ALLERBERGER et al. 2003). Daneben kommen weitere Lebensmittel, wie zum Beispiel Fleisch und -produkte von Rind, Schaf oder Schwein als Infektionsquelle in Betracht (FEHLHABER 1992). Inwiefern rohes oder unzureichend erhitztes Schweinefleisch eine Rolle für humane Campylobacteriosen spielt, konnte bislang noch nicht ausreichend geklärt werden. Über das Vorkommen des Erregers beim Schwein wird im Kapitel 2.2.8.2 berichtet.

Da Oberflächenwasser häufig mit *Campylobacter* kontaminiert ist, kommt dieses ebenso als Infektionsquelle in Frage. Durch fäkale Kontamination kann eine Infektion auch über Rohmilch erfolgen (KIST 2002). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist vor allem bei Kindern aufgrund der niedrigen Infektionsdosis (≥ 500 Keime) möglich (ANON. 1999a). Des Weiteren gilt *Campylobacter* als häufigste Ursache der Reisediarrhoe. Fallkontrollstudien zeigten, dass Durchfallerkrankungen, die zwei bis drei Wochen nach Reisen in südliche Länder auftraten, signifikant mit dem Vorliegen von *Campylobacter*-Infektionen korrelieren (KIST 2002). Auch eine Übertragung durch Haustiere ist möglich. Meist ist die Ursache der Kontakt mit erkrankten jungen Hunden und Katzen (SKIRROW et al. 1980, MILLER et al. 1987, WOLFS et al. 2001).

2.2.6 Isolierung und Identifizierung

2.2.6.1 Isolierung

Die Wahl der Isolierungsmethode ist abhängig vom Probenmaterial. Während in Stuhlproben von an akuter Enteritis erkrankten Patienten der Erreger meist in sehr hohen Konzentrationen vorliegt und oft schon der Nachweis mittels eines Direktausstriches möglich ist, empfiehlt sich bei Lebensmittelproben sowie bei Guillain-Barré-Syndrom (GBS)-Patienten, wo die Keimzahl gering ist oder die Zellen subletal geschädigt sind, das Voranstellen einer Anreicherung (BAYLIS et al. 2000, KIST 2002).

Eine bakteriologische Nachweismethode nach §35 LMBG existiert nicht.

2.2.6.1.1 Anreicherungsverfahren

Eine Vielzahl von Anreicherungsmedien ist in der Literatur beschrieben. Einen Überblick gibt Tabelle 5.

Tab. 5: Überblick über verschiedene Anreicherungsmedien

Anreicherungsmedium	Quelle
Preston-Bouillon	BOLTON et al. (1982)
Bolton-Bouillon	HUNT et al. (1998)
<u>C</u> ampylobacter <u>e</u> nrichment <u>b</u> roth (CEB)	MARTIN et al. (1983)
Bouillon nach Doyle und Roman	DOYLE und ROMAN (1982)
<u>V</u> ancomycin- <u>T</u> rimethoprim- <u>P</u> olymyxin-B-Bouillon (VTP)	PARK et al. (1981)
<u>B</u> roth <u>e</u> nrichment <u>m</u> edium (BEM)	ROGOL et al. (1985)
Exeter Bouillon	DE BOER und HUMPHREY (1991)

Den Medien werden zur Unterdrückung der Begleitflora Antibiotika zugesetzt. Zumeist werden Cefoperazon, Cycloheximid, Trimethoprim, Rifampicin, Vancomycin und Polymyxin B in verschiedenen Kombinationen genutzt. Bei einem Vergleich von Bolton-, Preston- und CE-Bouillon zum Nachweis des Erregers aus Lebensmitteln erwiesen sich Bolton- und CE-Bouillon als besser geeignet (CORY et al. 1995).

2.2.6.1.2 Selektivnährmedien

Um *Campylobacter* spp. aus den oft stark mit Begleitflora behafteten Proben isolieren zu können, bedurfte es der Entwicklung von Selektivnährböden oder Isolationstechniken. Auf der starken Motilität der Erreger beruht die Filtrationstechnik. Hierbei wird der Umstand ausgenutzt, dass sich *Campylobacter* schneller als andere Darmbakterien durch einen 0,65-µm-Zellulosefilter bewegen kann. Mit dieser Methode können seltene Spezies wie *C. upsaliensis* auf antibiotikafreiem Blutnährboden isoliert werden (KIST 2002). Für die Isolierung von *C. coli* und *C. jejuni* eignen sich die in Tabelle 6 aufgeführten Selektivnährmedien.

Tab. 6: Überblick über verschiedene Selektivnährböden

Nährboden	Quelle
<u>M</u> odified <u>C</u> harcoal- <u>C</u> efoperazon- <u>D</u> eoxycholate- <u>A</u> gar (mCCDA)	HUTCHINSON und BOLTON (1984)
Preston-Agar	BOLTON und ROBERTSON (1982)
Skirrow-Agar	SKIRROW (1977)
Modifizierter Skirrow-Agar	KARMALI und FLEMING (1979)
Karmali-Agar (CSM)	KARMALI et al. (1986)
Butzler-Agar	GOOSSENS et al. (1983)
Blaser-Wang-Agar	BLASER et al. (1978)
<u>S</u> emisolid blood-free <u>s</u> elective- <u>m</u> otility medium (SSM)	GOOSSENS et al. (1989)
<u>C</u> efoperazone- <u>A</u> mphtericin- <u>T</u> eichoplainin-Medium (CAT)	ASPINALL et al. (1996)

Der mCCD-Agar, der wie der Karmali-Agar Kohle enthält, eignet sich besonders gut für die Isolierung thermophiler *Campylobacter*-Spezies (GUN-MUNRO et al. 1987, BOLTON et al. 1988, MADDEN et al. 2000). In den meisten Laboren werden die Platten microaerob bei 42°C inkubiert. Aber eine Studie zeigte, dass eine Bebrütung bei nur 37°C die Isolierungsrate anhebt (BOLTON 1988). Thermophile *Campylobacter*-Spezies können zwei Wuchsformen zeigen. Als flache, graue, unregelmäßig begrenzte Kolonien mit Neigung zum Schwärmen findet man sie auf frischen, feuchten Nährböden und als erhabene, runde, graue, glänzende Einzelkolonien auf älteren, angetrockneten Platten (NACHAMKIN et al. 2000b).

2.2.6.2 Identifizierung

Einen ersten Hinweis gibt die Koloniemorphologie (siehe 2.2.6.1.2). Der Verdacht erhärtet sich, wenn sich die Erreger in der Gramfärbung in ihrer typischen, korkenzieherartig gewundenen Form darstellen (NACHAMKIN et al. 2000b). Leider verhalten sie sich in biochemischen Tests relativ inaktiv, was die Speziesdiagnose erschwert. *C. jejuni* und *C. coli* unterscheiden sich biochemisch nur in der Hippurathydrolysereaktion. Diese sollte bei *C. jejuni* positiv ausfallen. Aber es gibt auch hippuratnegative *C. jejuni*-Stämme, die somit fälschlicherweise als *C. coli* identifiziert werden (RAUTELIN et al. 1999, STEINHAUSEROVA et al. 2001). Aber auch umgekehrt ist die Verwechslung möglich. So zeigten STEINHAUSEROVA et al. (2001), dass sich Stämme, welche sich biochemisch als *C. jejuni* darstellten, in der PCR-RFLP als *C. coli* erwiesen. Zum biochemischen Nachweis ist kommerziell der API Campy (Fa. BioMerieux) erhältlich, jedoch gilt dieser aufgrund seiner mangelnden Sicherheit als umstritten (HUYSMANS et al. 1995, REINA et al. 1995).

Die Prüfung des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen kann einen Hinweis auf die Spezies geben. Schon 1962 beschrieb KING (1962), dass „related vibrios“ sowohl bei 37°C als auch bei 42°C wachsen können. Im Gegensatz hierzu ist *C. fetus* nur in der Lage, bei niedrigen Temperaturen (ca. 25°C) zu wachsen. Auch die Serotypisierung (siehe 2.2.3), die Phagen- und Resistotypisierung sind zur Identifizierung beschrieben, werden aber aufgrund diverser Probleme nur selten angewandt.

Besser als phänotypische sind genotypische Methoden zur Identifizierung geeignet. Auch für das Genus *Campylobacter* und seine verschiedenen Spezies existiert eine Vielzahl von PCR-Protokollen. Oft genutzte Zielgene sind beispielsweise *cadF*, *ceuE*, *flaA*, *hipO*, das GTPase-Gen und das *16S* rRNA-Gen (OYOFO et al. 1992, GONZALES et al. 1997, LINTON et al. 1997, VAN DOORN et al. 1997, VANNIASINKAM et al. 1999, BANG et al. 2002, CLOAK und FRATAMICO 2002).

2.2.7 Pathogenitätsfaktoren

Bis heute ist nur wenig über die Anforderungen bekannt, die erfüllt sein müssen, damit *Campylobacter* die Darmschleimhaut kolonisieren kann. Motilität und Chemotaxis scheinen hierfür von Bedeutung zu sein (HU und KOPECKO 2000). Die Bewegung ist aufgrund der aus zwei Untereinheiten bestehenden Geißel möglich, die wiederum durch zwei Gene, *flaA* und *flaB*, kodiert wird (LEE et al. 1986). Im Mausmodell konnten geißellose Mutanten nicht kolonisieren (NEWELL et al. 1985). Die Chemotaxis wird unter anderem durch Bestandteile des Muzins wie L-Fucose und L-Serin sowie durch organische Säuren wie Succinat und Pyruvat ausgelöst. Eine Vielzahl von Genen (wie z.B. *cheA*, *cheY*, *cheR*, *cheW*) kodieren für diese Fähigkeit. Das CheY-Protein scheint der „Antrieb“ für die Flagellen zu sein. Mutanten ohne *cheY* sind nicht in der Lage, auf halbfesten Medien zu schwärmen (MARCHANT et al. 2002). Andere Mutanten, welche zwar voll motil waren, denen aber die Fähigkeit der Chemotaxis fehlte, konnten im Tiermodell im Darm nicht kolonisieren (TAKATA et al. 1992).

Eine weitere Voraussetzung für die Pathogenität ist die Adhäsion an das Darmepithel. *Campylobacter* spp. binden an das Fibronektin der extrazellulären Matrix. Diese Bindung wird über ein 37-kDa-Außenmembranprotein vermittelt, das durch das *cadF*-Gen kodiert wird. Im Tierversuch konnten *cadF*-Mutanten nicht in Hühnerküken kolonisieren (ZIPRIN et al. 1999). Die Rolle weiterer Adhäsine wie PEB1, Fimbrien und Außenmembranproteine verschiedener Größen ist unklar. Ihre Bedeutung für die Pathogenese wird aufgrund des Vorkommens einer Vielzahl von Adhäsionsfaktoren verkompliziert (HU und KOPECKO 2000). Die Adhäsion ist bei 24 Stunden alten Kulturen am stärksten ausgeprägt, 72 Stunden alte Kulturen zeigen einen signifikanten Abfall in der Adhäsionsfähigkeit. Auch die Temperatur hat einen Einfluß auf das Adhäsionsvermögen. Dieses ist am stärksten bei *Campylobacter*-Keimen, die bei 37°C bebrütet werden. Erfolgt die Bebrütung bei 42°C, sinkt es um 66% (KONKEL et al. 1992).

Für die Invasion ist vor allem ein etwa 73 kDa großes Protein, CiaB, von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass Mutanten, welchen das *ciaB*-Gen fehlt, signifikant weniger in Zellen aufgenommen wurden (KONKEL et al. 1999). Die Aufnahme in die Wirtszelle erfolgt vermutlich über einen mikrotubulus-abhängigen Mechanismus (KOPECKO et al. 2001).

Auch bei dieser Bakterienart besteht wie bei anderen gramnegativen Keimen die äußere Hülle aus Lipopolysacchariden. Zumeist werden aber nur Lipooligosaccharide und kein komplettes LPS gefunden (FRY et al. 1998). Es wird angenommen, dass das LPS von Bedeutung für die Adhäsion ist (MCSWEEGAN und WALKER 1986). Eine Rolle spielt das LPS auch bei der Entwicklung des Guillian-Barré-Syndroms, da die Strukturen von Oberflächenoligosacchariden denen humaner Ganglioside sehr ähneln (PENN 2001). Antikörper, die gegen diese bakteriellen Oberflächenmoleküle gebildet werden, können somit die humanen Ganglioside zerstören. Das LPS ist die Grundlage für die Serotypisierung nach Penner. Da diese Strukturen hochgradig variabel sind, wird die Serotypisierung erheblich erschwert (GILBERT et al. 2002).

Über die Existenz von Toxinen gibt es sehr kontroverse Angaben. Bis jetzt konnte nur das Cytolethaldistending-Toxin (CDT) molekulargenetisch charakterisiert werden. Kodiert wird es durch das *cdtABC*-Gen. Seine toxische Wirkung beruht wahrscheinlich auf einer Blockade des Zellzyklus in der G2-Phase. Somit wird die Reifung von Kryptenzellen zu funktionstüchtigen Villus-Epithelzellen unterbunden (KIST 2002). Auch über das Vorhandensein von Enterotoxinen liegen zahlreiche Berichte vor. Es wurde sogar angenommen, dass *C. jejuni* ein Enterotoxin produziert, welches mit dem Cholera-toxin verwandt ist. Aber nach Sequenzierung des gesamten Genoms konnten keine Gene gefunden werden, die dieses Toxin kodieren (PICKETT 2000). Eine ausführliche Übersicht über die *Campylobacter*-Toxine ist bei WASSENAAR (1997) zu finden.

2.2.8 Infektion mit *Campylobacter* spp. bei Mensch und Tier

2.2.8.1 Mensch

Wie bei der Yersiniose gibt es bei der Campylobacteriose neben der intestinalen Verlaufsform auch extraintestinale Verläufe und Folgeerkrankungen. Die größte Bedeutung für humane Infektionen hat *C. jejuni*, der bei ca. 90% der humanen Campylobacteriosen isoliert werden kann. *C. coli* rangiert mit ca. 5-10% auf Rang zwei (TAM et al. 2003). Eine Häufung der Erkrankungen ist in den Sommermonaten zu beobachten (ALTEKRUSE et al. 1998). Die minimale Infektionsdosis liegt bei ≥ 500 cfu (ROBINSON und JONES 1981). Auch hier besteht eine Meldepflicht nach §7 IfSG.

Intestinale Verlaufsform

Nach einer Inkubationszeit von 2-7 Tagen beginnt die akute Enterocolitis mit einem Prodromalstadium, welches durch Kopf-, Muskel-, Bauch- und Rückenschmerzen sowie Schwindel, Übelkeit und Fieber gekennzeichnet ist (ANON. 1999a, SKIRROW und BLASER 2000, KIST 2002). Das Prodromalstadium geht dann mit zunehmenden Unterbauchkrämpfen in eine akute Durchfallsymptomatik mit bis zu 20 Entleerungen pro Tag über. Die Stühle sind wässrig, können aber in etwa einem Drittel der Fälle auch wässrig-blutig sein. Auch bei der Campylobacteriose kann wie bei der Yersiniose eine Pseudoappendizitis auftreten. Die Ursache ist ebenso eine terminale Ileitis mit Beteiligung mesenterialer Lymphknoten. Der Erreger konnte aber auch von echten Blinddarmentzündungen isoliert werden (MEGRAUD et al. 1982, CHAN et al. 1983).

Die Erkrankung ist in der Regel nach fünf bis sieben Tagen selbstlimitierend, die Keime werden aber in einer etwa dreiwöchigen asymptomatischen Phase weiter ausgeschieden (KIST 2002). Eine Disposition für die Erkrankung besteht bei Kindern unter sechs Jahren sowie bei jungen Erwachsenen zwischen 18 und 35 Jahren (ANON. 1999a). In dieser Altersgruppe sind vor allem junge Männer aufgrund ihrer schlechteren Küchenhygiene betroffen (ALTEKRUSE et al. 1998). Die Infektion beim Kind, vor allem beim Neugeborenen, verläuft sehr häufig anders als eben beschrieben. Der Verlauf der Erkrankung ist meist nicht so schwer und oft fehlt das Fieber. Dafür treten Erbrechen und blutige Stühle häufiger auf (SKIRROW und BLASER 2000). Ebenfalls milder verläuft die Erkrankung in Entwicklungsländern. Hier ist es hauptsächlich eine Kleinkinderkrankung, die mit wässrigem Durchfall einhergeht. Bei Kindern unter fünf Jahren ist die Inzidenz deutlich höher als in den Industrienationen, und eine symptomlose Ausscheidung kommt viel häufiger vor. Dass hier die Erkrankung kaum bei jungen Erwachsenen auftritt, wird damit in Zusammenhang gebracht, dass bereits im Kindesalter ein vielfacher Kontakt mit dem Erreger besteht und sich infolge dessen eine frühe Immunität ausbildet (OBERHELMAN und TAYLOR 2000, VAN VLIET und KETLEY 2001).

Extraintestinaler Verlauf/ Folgeerkrankungen

Als Folgeerkrankung kann eine reaktive Arthritis auftreten. Eine Disposition besteht bei HLA-B27-positiven Patienten. Besonders häufig sind die Kniegelenke involviert. Die Gelenkentzündung geht nicht selten mit einer Konjunktivitis einher, in 20% der Fälle wird ein komplettes Reiter-Syndrom (siehe auch 2.1.8.1) beschrieben (KIST 2002).

Eine selten auftretende Folge der Infektion, die aber lebensbedrohlich sein kann, ist das GBS. Es ist durch Beinschwäche, sensorische Störungen oder Schmerzen, begleitet von einer bilateral symmetrisch aufsteigenden Paralyse gekennzeichnet. Die Lähmungserscheinungen können bis hin zur Atemlähmung gehen, etwa 20% der Patienten müssen künstlich beatmet werden. Die Inzidenz des GBS liegt bei 1,3 (0,4-4,0) Fällen pro 100000 Personen. Ursache ist die Zerstörung der Myelinscheiden der peripheren Nerven. In den Myelinscheiden sind Ganglioside eingelagert, die zur Proteinfamilie der Sialinsäure-substituierten Glycosphingolipide gehören. Das *Campylobacter*-LOS ist sialinsäuresubstituiert und somit der Struktur der sialinisierten Ganglioside sehr ähnlich. Kommt es zur Antikörper-Bildung gegen Strukturen des LOS, können diese ebenso die Ganglioside der Myelinscheiden angreifen (NACHAMKIN et al. 2000a, HADDEN und GREGSON 2001, KIST 2002). Diese Theorie gilt aber als nicht gesichert, da es auch GBS-Patienten ohne dedektierbare Antikörper gibt und Antikörper zum Teil auch in gesunden Kontrollpersonen gefunden werden (HADDEN und GREGSON 2001).

Als seltene Komplikationen der Campylobacteriose kann es auch zu Entzündungen der Leber, der Gallenblase, des Pankreas, der Nieren, der Schleimbeutel, des harnableitenden Systems, der Prostata, des Herzmuskels, des Bauchfells und der Gehirnhäute sowie zu Empyemen kommen (SKIRROW und BLASER 2000).

Erkrankungszahlen

In vielen Industrienationen gilt die Campylobacteriose als die häufigste bakterielle Enteritisursache, in Deutschland liegt sie hinter den Salmonellen auf Rang zwei (KIST 2002). Tabelle 7 gibt einen Überblick über die in Deutschland gemeldeten Erkrankungszahlen.

Tab. 7: Gemeldete Erkrankungen durch *Campylobacter* spp. in Deutschland und Sachsen

Jahr	Fälle in Deutschland		Fälle in Sachsen	
	absolut	pro 100000 EW	absolut	pro 100000 EW
1999	28882 ^{*,1}	64,2 ^{*,1}	3889 ³	86,0 ³
2000	30876 ^{*,1}	68,9 ^{*,1}	4146 ³	92,4 ³
2001	54410 ²	66,2 ²	4817 ³	108,0 ³
2002	56350 ²	68,4 ²	5189 ³	117,3 ³
2003	47876 ²	58,0 ²	4346 ³	99,1 ³

Legende auf Seite 28

Legende zu Tab. 7:

*Daten aus nur 11 Bundesländern: Berlin, Brandenburg, Bremen, Hamburg, Hessen, Mecklenburg-Vorpommern, Nordrhein-Westfalen, Schleswig-Holstein, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen; EW Einwohner

¹ Daten gemäß deutschem Trendbericht (ANON. 2000a und 2001a)

² Daten gemäß Infektionsepidemiologischem Jahrbuch (ANON. 2002b, 2003a und 2004c)

³ Daten gemäß Landesuntersuchungsanstalt Sachsen (ANON. 2000b, 2001b, 2002c, 2003b und 2004d)

2.2.8.2 Schwein

Thermophile *Campylobacter*-Spezies sind häufig beim Schwein zu finden. Der Erreger scheint keine Bedeutung für Erkrankungen bei dieser Tierart zu haben (ALTEKRUSE und SWERDLOW 2002). Er ist wahrscheinlich der normalen Darmflora zuzurechnen (GÖRGEN et al. 1983). Beim Schwein ist fast ausschließlich *C. coli* zu finden. Einzelne Untersuchungen zeigen aber auch, dass *C. jejuni* in bestimmten Beständen sehr häufig isoliert werden kann (STICHT-GROH 1982, YOUNG et al. 2000). Möglicherweise unterscheidet sich die Spezies von Betrieb zu Betrieb oder in verschiedenen geographischen Regionen. Ebenso kann dieser Fund auch mit der Schädnerpopulation in Zusammenhang stehen oder auf unsicheren, subjektiven Tests wie der Hippurathydrolyse beruhen (YOUNG et al. 2000).

Eine Infektion der Ferkel erfolgt durch die Muttersau, die den Erreger mit dem Kot ausscheidet (WEIJTENS et al. 1997). HARVEY et al. (2000) konnten in einem Versuch zeigen, dass bei Ferkeln, welche binnen der ersten 24 Stunden nach der Geburt von der Sau getrennt wurden, nach 20 Tagen deutlich weniger Ferkel den Erreger trugen als bei von der Sau aufgezogenen Vergleichsferkeln, obwohl es zum Zeitpunkt der Geburt keine Prävalenzunterschiede gab. Auch zeigte sich bei dem Versuch, dass die Ferkel bereits binnen der ersten 24 Stunden besiedelt werden können und, wenn sie bei der Sau bleiben, auch weiterhin den Erreger tragen. Bei den mutterlos aufgezogenen Tieren verringerte sich die Anzahl von Ausscheidern binnen der 20 Tage deutlich. Das verdeutlicht, dass ein mehrfacher Kontakt mit dem Kot der Sauen notwendig ist, damit der Erreger erfolgreich kolonisieren kann.

Die *Campylobacter*-Keimzahl im Kot nimmt mit dem Alter der Tiere ab. Zu Beginn der Mast liegt sie bei ca. 10^4 cfu/ g Kot, am Ende der Mast bei etwa 10^2 cfu/ g Kot (WEIJTENS et al. 1993 und 1999). Ebenso fanden YOUNG et al. (2000) bei vierzehn Tage alten Ferkeln höhere Keimzahlen als bei Jungsauen und tragenden Sauen.

Ein Schwein kann zu einem Zeitpunkt bis zu fünf verschiedene Genotypen tragen, im Verlaufe seiner Mast können sogar bis zu acht Genotypen isoliert werden. In einem Betrieb gibt es eine Vielzahl von Genotypen, aber ein Typ (bzw. Cluster) ist dominant und kann in den verschiedenen Produktionsstufen wiedergefunden werden (WEIJTENS 1997, GAULL 2002). Ebenso ist es möglich, dass der Erreger alternierend ausgeschieden wird (WEITENS et al. 1999, GAULL 2002).

Nicht nur im Darminhalt, sondern auch in der Gallenblase kann diese Bakterienart gefunden werden. So isolierte ROSEF (1981) bei 58% der Gallenblasen *Campylobacter* spp. und GÖRGEN (1983) bei 14%. Ebenso wie *Y. enterocolitica* ist *Campylobacter* auch in den Tonsillen zu finden. So konnten NESBAKKEN

et al. (2002) zum Zeitpunkt der Schlachtung den Erreger in 66,7% der untersuchten Rachenmandeln mittels PCR finden, die Prävalenz im Kot betrug 100%, bestimmt mit einer ELISA-Methode.

In Tabelle 8 sind Nachweisraten von *Campylobacter* spp. aus Faecesproben vom Schwein zusammengefasst.

Tab. 8: kulturelle Nachweisraten thermophiler *Campylobacter* aus Faecesproben vom Schwein

Alter bzw. Produktionsstufe	<i>Campylobacter</i> (%)	davon <i>C. coli</i> (%)	davon <i>C. jejuni</i> (%)	Quelle
Mast	70	76,6	23,4	STICHT-GROH (1982)
Muttersauen	100	-	-	GÖRGEN et al. (1983)
bis 3. LW	48	-	-	
3. bis 6. LW	100	-	-	
Absetzer (15-25 kg)	66,7	-	-	
Läufer (25-50 kg)	90	-	-	
11. LW	97,5	-	-	WEIJTENS et al. 1993
22. LW	98,8	-	-	
Schlachthof	85,1	-	-	
Muttersauen	90	-	-	WEIJTENS et al. 1997
1. LW	48,3	-	-	
4. LW	86,7	-	-	
8. LW	91,7	-	-	
Jungsauen	76	21	76,3	YOUNG et al. (2000)
Tragende Sauen	100	11	89	
1. LT	100	68,3	31,7	
14. bis 17. LT	100	18	82	
Muttersauen	100	100	0	GAULL (2002)
1. LW	20	100	0	
2. LW	26,7	100	0	
3. LW	89,3	100	0	
12. LW	80,8	100	0	
18. LW	84	100	0	
Schlachthof	81,8	100	0	
Schlachthof	95,8	90	0*	NESBAKKEN et al. (2002)

LW = Lebenswoche; LT = Lebenstag; *15% der Isolate wurden als *C. lari* identifiziert, wobei von einem Tier *C. coli* und *C. lari* isoliert wurde.

2.2.8.3 Andere Tierarten

Rind:

Auch Rinder sind häufig Träger von *Campylobacter* spp. Die Angaben zur Prävalenz differieren deutlich. So fanden beispielsweise ROSEF et al. (1983) bei nur 0,8% der untersuchten Kotproben den Erreger, ABATAY und CORRY (1989) konnten ihn in 79% der Proben nachweisen. Die Isolationsrate ist auch davon abhängig, ob eine Anreicherung vorangestellt wird oder ob ein Direktausstrich erfolgt. So isolierten STANLEY et al. (1998a) bei 89,4% der Proben den Erreger nach Anreicherung im Preston-Medium, ohne Anreicherung waren nur 26,7% der Proben positiv. Genau wie beim Schwein scheiden ältere Tiere den Erreger in geringeren Konzentrationen aus als Jungtiere. Die Ausscheidung kann auch bei dieser Tierart intermittierend sein.

Schaf:

Die Nachweisraten thermophiler *Campylobacter* im Darm von Schlachtlämmern ist sehr hoch. So konnten STANLEY et al. (1998b) in über 90% der untersuchten Proben thermophile *Campylobacter* nachweisen. Bei erwachsenen Schafen liegt die Ausscheidungsrate zwischen 0 und 100%. Beispielsweise konnte der Keim bei Fütterung mit Heu und Silage nicht nachgewiesen werden, aber kurz nach dem Ablammen war eine Isolierung von nahezu allen Mutterschafen möglich. Die Lämmer waren nach fünf Tagen zu 100% besiedelt. Auch scheiden sie den Erreger in höheren Konzentrationen als adulte Tiere aus. Die Ausscheidungsraten hängen auch vom Weideland ab. Beim Weidegang auf salzigem Marschland ist die Ausscheidung höher als beim Grasens im Hochland oder auf der Farm. Auch ist die Prävalenz auf der Weide um zwei Drittel bis einhalb mal niedriger als zum Schlachtzeitpunkt. Die am häufigsten isolierte Spezies ist *C. jejuni* (JONES et al. 1999).

Hund und Katze:

Auch von diesen Tierarten ist eine Isolierung häufig möglich. So konnten in Schweden von 91 überwiegend gesunden Hunden 51 mal (56%) thermophile *Campylobacter* isoliert werden. Signifikante Unterschiede in der Isolierungsrate waren zwischen jungen (5-12 Monate alten) und älteren Hunden (13 Monate oder älter) zu beobachten. Während 76% der bis einjährigen positiv waren, trugen nur 39% der über ein Jahr alten Hunde den Erreger. Die dominierende Spezies war bei dieser Untersuchung *C. upsaliensis* (42,9%), gefolgt von *C. jejuni* (11,0%) (ENGVALL et al. 2003). Bei einer spanischen Studie wurde überwiegend *C. jejuni* (61,1%) isoliert. Auch hier waren vor allem Jungtiere (bis sechs Monate) betroffen (TORRE und TELLO 1993). STEINHAUSEROVA et al. (2000) untersuchten 225 Kotproben von an Durchfall erkrankten Hunden und Katzen (208 Hunde und 17 Katzen). Insgesamt konnten 51 *Campylobacter*-Stämme isoliert werden. *C. jejuni* wurde mit 57% am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von *C. upsaliensis* mit 22%. Die erste genetisch bewiesene Übertragung von *C. jejuni* von einem Hund auf einen Menschen wurde 2001 veröffentlicht (WOLFS et al. 2001).

Nutzgeflügel:

Thermophile *Campylobacter* spp. können sehr häufig vom Geflügel isoliert werden. Bei Hühnern ist überwiegend *C. jejuni* zu finden (DENIS et al. 2001, FALLON et al. 2001, NADEAU et al. 2002), während bei Puten ebenfalls *C. coli* häufig isolierbar ist (BORCK et al. 2001, LOGUE et al. 2003). Eine dänische Studie zeigte, dass bei Broilerbeständen mit ökologischer Freilandhaltung die Durchseuchung 100% beträgt, Bestände mit Käfighaltung hingegen waren nur zu 36,7% durchseucht. Eine Mittelstellung nehmen Herden mit extensiver Bodenhaltung ein, hier waren 49,2% positiv (HEUER et al. 2001). Eine vertikale Übertragung des Erregers scheint nur von untergeordneter Bedeutung zu sein, da Küken in der ersten Lebenswoche nur sehr selten kolonisiert sind. Die Durchseuchung der Herden erfolgt in der Regel zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche (KIST 2002). Die Infektionsquellen sind wahrscheinlich das Tränkwasser, Personal, welches den Erreger aus anderen Betriebsteilen einschleppt, sowie Schädlinge, Wildvögel und Insekten (CORY und ATABAY 2001).

2.2.9 Lebensmittelhygienische Bedeutung

2.2.9.1 Fleisch und Fleischerzeugnisse sowie Fisch

Unzureichend erhitztes oder rekontaminiertes Geflügelfleisch stellen die Hauptinfektionsquelle für den Menschen dar. Diese Warengruppe wurde bereits vielfach auf das Vorkommen thermophiler *Campylobacter* spp. untersucht. Die Isolierungsraten bei Hühnerschlachttierkörpern oder bei Teilstücken liegen zumeist zwischen 20 und 80%, wobei *C. jejuni* den Hauptanteil ausmacht (KWIA TEK et al. 1990, ONO und YAMAMOTO 1999, KRAMER et al. 2000, URSINITSCH et al. 2001, FREDIANI-WOLF und STEPHAN 2003). Bei Putenfleisch liegt die Isolierungsrate bei etwa 5-25%. Häufig wird bei dieser Fleischart neben *C. jejuni* auch *C. coli* gefunden (KWIA TEK et al. 1990, GAULL et al. 2003). Auch molekularbiologische Fingerprintingmethoden konnten zeigen, dass häufig eine enge Verwandtschaft zwischen Geflügelstämmen und Stämmen von Humanerkrankungen besteht (DUIM et al. 1999 und 2000, GAULL 2002, NADEAU et al. 2002). Dass der Erreger die Kühlung so gut übersteht, liegt offensichtlich an der Struktur der Geflügelhaut. In den Federfollikeln oder in Hautfalten ist oft genügend Wasser zum Überleben vorhanden, ebenso sind die Verhältnisse mikroaerob (CHANTARAPANONT et al. 2003).

Auch Schweine und Rinder sind häufig Träger thermophiler *Campylobacter* spp., ihr Fleisch hingegen ist nur sehr selten kontaminiert. Der Erreger ist zumeist nur in 0-3% (max. 10%) der Proben nachweisbar (DE BOER und HAHNÉ 1990, KWIA TEK et al. 1990, TOKUMARU et al. 1991, ONO und YAMAMOTO 1999, PEZZOTTI et al. 2003). Deutlich stärker als das Fleisch dieser Tierarten sind ihre Lebern belastet. So konnten KRAMER et al. (2000) in 71,1% der Schweinelebern, in 54,2% der Rinderlebern und in 72,9% der Lammlebern thermophile *Campylobacter* nachweisen. SCATES et al. (2003) fanden den Erreger in 80% der untersuchten Lammlebern. Als Ursache dieser hohen Prävalenzen vermuten sie eine Kreuzkontamination, da die Lebern zu mehreren Kilogramm in jeweils einem Paket unter Luftabschluss verpackt werden. Fleischprodukte von Rind, Kalb und Schwein wurden von LOEWENHERZ (1995) auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht. Bei 121 untersuchten Proben konnte nur in einem Tiefkühlhamburger der Erreger nachgewiesen werden.

Fisch wurde bislang kaum auf *Campylobacter* spp. untersucht. In zwei von 39 Fischfilets konnte LOEWENHERZ (1995) *Campylobacter* spp. nachweisen. Im Vergleich zu Fisch sind Schalentiere häufiger Träger dieser Bakterien. So isolierten WILSON und MOORE (1996) aus 42% der untersuchten Muschelproben thermophile *Campylobacter* spp., ENDTZ et al. (1997) fanden in 41 von 59 untersuchten Muschelchargen und in 11 von 41 Austernchargen den Erreger.

2.2.9.2 Milch und Milchprodukte

Bereits im Oktober und November 1978 wurden zwei Campylobacteriose-Ausbrüche beschrieben, die mit der Aufnahme von nicht pasteurisierter Milch in Zusammenhang standen (ROBINSON et al. 1979). Die Milch kann selbst bei einwandfreier Stall- und Melkhygiene fäkal kontaminiert werden und es erfolgt keine routinemäßige Untersuchung auf diesen Keim (THURM et al. 2000). Bei Untersuchungen schwanken die Isolationsraten zumeist zwischen 0 und 2%, aber in Einzelfällen kann der Erreger auch aus bis zu 10% der Proben isoliert werden (SCHEIRLE 1988, STEELE et al. 1997, STILLER 1998, JAYARAO und HENNING 2001).

Bis in die heutige Zeit sind Ausbrüche in Zusammenhang mit Milch oder Milchprodukten in Deutschland keine Seltenheit (THURM und DINGER 1996, ANON. 1997, THURM et al. 1999, ANON. 2000c). Ein Grund hierfür dürfte im Trend zur Direktvermarktung im Rahmen der sogenannten Ökowelle liegen (THURM et al. 2000).

2.2.9.3 Wasser

Oberflächenwasser ist häufig mit *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* kontaminiert. Durch die Aufnahme von nicht oder nur ungenügend gechlortem Wasser oder von Lebensmitteln, die mit solchem Wasser in Kontakt kamen, kann eine Infektion erfolgen (HU und KOPECKO 2003).

Der Eintrag in die Gewässer erfolgt über Tiere, vor allem über landwirtschaftliche Nutztiere und Vögel. Besonders stark sind Gewässer betroffen, die unterhalb des Einzugsbereiches landwirtschaftlicher Betriebe liegen. Die Isolationsraten sind in kühlen Monaten höher als in den warmen, wo zusätzlich noch eine erhöhte UV-Belastung die Keime schädigt. Ebenso sind Park- und Zierteiche, vor allem solche mit hoher Wassergeflügeldichte, häufig sehr belastet (JONES 2001). Auch in den letzten Jahren wurden wasserassoziierte Ausbrüche im mitteleuropäischen Raum beschrieben (ENGBERG et al. 1998, MAURER und STURCHLER 2000).

2.2.10 Möglichkeiten der Bekämpfung in Schweinebeständen

Grundsätzlich ist die Frage zu stellen, ob eine Bekämpfung in Schweinebeständen notwendig ist. Dagegen spricht, dass humane Campylobacteriosen hauptsächlich durch *C. jejuni* verursacht werden, dieser Erreger jedoch nur selten vom Schwein isoliert werden kann. Des Weiteren ist die Kühlung des Tierkörpers in Kombination mit der Austrocknung der Haut nach der Schlachtung sehr effektiv, so dass nach diesem Prozess der Erreger kaum noch zu finden ist. Auch in Schweinefleisch und -produkten (außer Lebern) ist er nur selten nachweisbar. Für eine Bekämpfung spricht die dennoch potentielle Gesundheitsgefährdung, da momentan noch nicht abzuschätzen ist, wie häufig VBNC-Stadien auf dem Tierkörper und im Fleisch vorhanden sind. Des Weiteren scheint es möglich, dass Schweinebestände den Erreger auf benachbarte

Geflügelbestände übertragen. So konnten JACOBS-REITSMA et al. (1995) von Schweinen und Geflügel, die auf der selben Farm gehalten wurden, auch gleiche Serotypen isolieren.

In der Literatur sind bislang keine Möglichkeiten zur Erregerbekämpfung beim Schwein beschrieben, hingegen liegen zahlreiche Untersuchungen beim Küken vor. Erfolg versprechend scheinen bei dieser Tierart Impfungen zu sein (NOOR et al. 1995, RICE et al. 1997). Auch an Mäusen wurden Impfungen getestet. So berichteten DOLBY und NEWELL (1986), dass die Immunität für *C. jejuni* von den Muttertieren, die vor der Paarung intraperitoneal immunisiert wurden, auf die Jungtiere übertragen wird. Eine andere Möglichkeit der *Campylobacter*-Bekämpfung beim Küken ist die kompetitive Verdrängung (Competitive Exclusion, CE). Unter CE versteht man den schützenden Effekt, der dadurch gegeben ist, dass die natürliche Darmflora die Kolonisation mit pathogenen Erregern begrenzt, da eine Konkurrenz um Nischen und Nährstoffe besteht. Zum Schlupfzeitpunkt sind im Darm keine Bakterien vorhanden. Die Besiedlung erfolgt in den ersten Lebenstagen durch den Kontakt mit dem Kot der Glucke. Da industriell die Eier künstlich bebrütet werden und ein Kontakt zum Muttertier und die damit verbundene Aufnahme von darmstabilisierenden Mikroorganismen nicht möglich ist, werden den Jungtieren CE-Kulturen oder Probiotika verabreicht (JEFFREY 1999). Die CE wird z.B. zur Kontrolle des Salmonellenproblems in Skandinavien erfolgreich genutzt. Zur Verdrängung von *Campylobacter* spp. wurden CE-Kulturen mit wechselndem Erfolg getestet. Alternativ zu CE-Kulturen könnten *Campylobacter*-Stämme genutzt werden, die, um optimalen Erfolg zu garantieren, folgenden drei Anforderungen gerecht werden müssen: sie müssen stark kolonisieren, um bereits vorhandene Stämme zu verdrängen, die Virulenzfaktoren müssen erkannt und entfernt worden sein, und der apathogene Phänotyp muß stabil bleiben (NEWELL und WAGENAAR 2000). Studien bezüglich der CE beim Schwein liegen nicht vor, aber es ist denkbar, dass die Methode auch bei dieser Tierart Erfolge zeigen könnte (WEIJTENS 1996). WEIJTENS et al. (2000) demonstrierten, dass es möglich ist, den Erreger auf einem niedrigen Niveau zu halten oder freie Bestände aufzubauen. Das Prinzip beruht darauf, in gründlich gereinigten und desinfizierten Stallungen, die nach Möglichkeit noch eine gewisse Zeit leer standen, mit *Campylobacter*-freien Sauen (aus SPF-Herden) eine Herde aufzubauen. Sauen sind aufgrund ihrer stabileren Darmflora weit weniger für den Erreger empfänglich als Ferkel, außerdem wird durch die zumeist praktizierte Haltung in Einzelständen eine Koprophagie unterbunden. Die negativen Sauen können ihre Jungen nicht infizieren, die bleibenden Infektionsquellen sind Futter und Wasser sowie belebte Vektoren einschließlich des Menschen. Aufgrund des geringen Feuchtigkeitsgehaltes kann das Futter als Infektionsquelle nahezu ausgeschlossen werden (ALTEKRUSE und SWERDLOW 2002). Allerdings liegen Futtermitteluntersuchungen auf *Campylobacter* spp. offensichtlich nicht vor. Das Risiko, den Erreger über das Wasser in den Bestand einzuschleppen, kann durch die Nutzung von chloriertem Wasser minimiert werden. Durch Fernhalten von Vögeln, Schadnagern und Insekten in Kombination mit einem strikten Hygieneregime sollte es möglich sein, die Erregereintragung zu unterbinden oder zumindest zu begrenzen.

2.3 Genotypische Differenzierungsmethoden

Es gibt eine Vielzahl von Genotypisierungsmethoden zur Charakterisierung von *Y. enterocolitica* und *Campylobacter* spp., die auf der Nutzung von Restriktionsenzymen basieren. Im Allgemeinen werden solche Methoden als Restriktionsenzymanalyse (REA), Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) oder Bacterial Restriction Enzyme DNA Analysis (BRENDAs) bezeichnet. Oft werden sie auch mit der PCR kombiniert. In diesem Abschnitt soll nur kurz auf zwei in dieser Arbeit genutzte Methoden eingegangen werden.

2.3.1 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Die AFLP ist eine noch recht junge Genotypisierungsmethode, die ursprünglich zur Beschreibung von Verwandtschaftsverhältnissen bei Pflanzen entwickelt wurde (VOS et al. 1995). Schon kurz darauf wurde sie auch bei Bakterien angewandt (JANSSEN et al. 1996). Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass man keine Kenntnisse über die DNA-Sequenz der zu untersuchenden Probe haben muß. Weitere positive Aspekte sind, dass das gesamte Genom berücksichtigt wird und nur geringe DNA-Mengen benötigt werden. Vorab muß aber die Spezieszugehörigkeit geklärt werden, da jegliche DNA, egal welchen Ursprungs, verdaut und amplifiziert wird.

Die AFLP beinhaltet vier Schritte. Der erste ist der Verdau der DNA mittels bakterieller Restriktionsenzyme. Dafür wird ein Enzym mit einer kurzen Erkennungssequenz („frequent cutter“, z.B. *MseI*, *HhaI*) und ein Enzym mit einer langen Erkennungssequenz („rare cutter“, z.B. *EcoRI*, *HindIII*) genutzt. Als zweiter Schritt folgt die Ligation von doppelsträngigen Adaptoren an die in Schritt eins entstandenen DNA-Fragmente mit Hilfe der DNA-Ligase. Dabei muß die Adaptersequenz so gewählt werden, dass die ursprünglichen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme nicht mehr hergestellt werden und somit die um den Adapter verlängerten Fragmente nicht erneut gespalten werden können. Daher ist es möglich, Schritt eins und zwei auch parallel ablaufen zu lassen. Die letzten beiden Schritte sind die preselektive und die selektive PCR. Bei der preselektiven PCR werden Primer genutzt, die komplementär zu den Adaptoren sind, teilweise kommen auch Primer zum Einsatz, die am 3'-Ende bereits um ein Nucleotid verlängert wurden. Bei der selektiven PCR wird das Produkt der ersten PCR als Template verwendet. Die Primer haben exakt die gleiche Sequenz, jedoch sind diese an ihren 3'-Enden nochmals um ein, zwei oder drei Nukleotide verlängert. Das hat zur Folge, dass in diesem letzten Schritt nur jedes vierte (bzw. jedes 256. oder jedes 4096.) Fragment vervielfacht wird. Somit wird die Vielzahl der Fragmente auf ein gut auswertbares Maß (max. 100 Banden) reduziert. Anschließend werden die PCR-Produkte auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Darstellung der Produkte ist durch radioaktiv markierte Primer, durch Fluoreszenzfarbstoff-gelabelte Nucleotide oder durch Färbung der Gele mit Silber oder Ethidiumbromid möglich. Die AFLP ist eine sehr stabile Methode und wird nicht durch kleinere äußere Einflüsse (z.B. Nutzung verschiedener Thermocycler, unterschiedliche Ausgangs-DNA-Konzentrationen) beeinträchtigt (SAVELKOUL et al. 1999, BERRES 2002, ANON. 2004a).

Zur Typisierung von *Campylobacter*-Isolaten wurde die Methode schon häufig genutzt (DUIM et al. 1999, 2000 und 2001, LINDSTEDT et al. 2000, HÄNNINIEN et al. 2001, ALTER und FEHLHABER 2003). *Y. enterocolitica* wurde auch bereits mittels AFLP typisiert, allerdings stellten sich alle pathogenen Stämme als nahezu identisch dar. Diese Methode ist folglich bislang nicht für epidemiologische Untersuchungen dieser Spezies geeignet.

2.3.2 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Die PFGE ist eine sogenannte Makrorestriktionsanalyse, die es erlaubt, DNA-Fragmente mit einer Größe von bis zu 10 mb aufzutrennen. Vor der Einführung dieser Methode durch SCHWARTZ und CANTOR (1984) war nur eine Auftrennung von DNA-Fragmenten möglich, die maximal 50 kb groß waren, da größere Fragmente bei der Agarose-Gelelektrophorese die gleiche Wandergeschwindigkeit aufweisen. Auch stellte es ein Problem dar, die gesamte chromosomale DNA in einem flüssigen Verdauopuffer zu extrahieren, da aufgrund der darin herrschenden Scherkräfte die DNA zerbrechen kann. Bei der PFGE werden komplette Bakterien in Gelblöckchen eingebettet und in diesen verdaut, um dem Problem der Scherkräfte zu entgehen. Der Verdau der DNA erfolgt mit Hilfe eines „rare cutters“, der oft eine Erkennungssequenz von 6 oder 8 Nucleotiden hat. Ist die DNA gereinigt und verdaut, werden die Gelblöckchen in die Slots vom Gel eingebracht und es folgt die Elektrophorese. Im Vergleich zur normalen Elektrophorese fließt der Strom nicht nur in eine Richtung, sondern das elektrische Feld ändert nach einer kurzen Zeit (Pulszeit) seine Richtung. Dabei muß ein Winkel von mindestens 90° eingeschlossen werden. Diese Änderung der Stromrichtung zwingt die DNA-Moleküle dazu, sich in eine andere Richtung zu bewegen. Zu der Problematik, warum sich die Moleküle unterschiedlich schnell durch das Gel bewegen, gibt es verschiedene Theorien. Eine ältere Theorie besagt, dass sich die Moleküle in einer komplett gestreckten Form durch das Gel bewegen. Ändert sich nun die Richtung des Feldes um über 90°, müssen sich die Moleküle neu orientieren, so dass nun ihr „Schwanzende“ zum führenden Ende wird. Ein anderes Modell besagt, dass die DNA-Moleküle durch Röhren im Gel in Schlangenlinien in einer zufälligen Richtung wandern aber mit einer Vorliebe für die Richtung des elektrischen Feldes. Die dritte Theorie geht davon aus, dass sich die Moleküle wie flexible Ketten durch ein Hindernisgitter bewegen. Dafür benötigen größere Moleküle offenbar mehr Zeit. Durch den ständigen Richtungswechsel des elektrischen Feldes laufen kleinere Moleküle schneller durch das Gel als große, so dass eine Auftrennung der Fragmente erfolgt.

Die Auftrennung der DNA wird durch viele Faktoren beeinflusst. Diese sind z.B. der eingeschlossene Winkel, die Feldstärke, die Gelkonzentration und die Temperatur. Den Haupteinfluss aber hat die Pulszeit. Je größer die Fragmente sind, desto länger sollte sie sein. Auch während des Laufes kann sie geändert werden. Moderne Geräte können so programmiert werden, dass sie die Pulszeiten selbständig ändern (HILLIER und DAVIDSON 1995, MRASS et al. 2004).

Diese Methode ist zur Typisierung von *Campylobacter* spp. und *Yersinia* bereits mehrfach angewandt worden (ASPLUND et al. 1998, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 1999b, PILON et al. 2000, PETERSEN et al. 2001, RIBOT et al. 2001, DICKINS et al. 2002).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Betriebe

Die Untersuchungen wurden in vier verschiedenen Betrieben durchgeführt. In drei Betrieben (Betriebe A-C) werden die Schweine konventionell gehalten, der vierte Betrieb (Betrieb D) produziert ökologisch. Alle Betriebe (außer der Maststall des Betriebs D) sind im Brandenburgischen Raum lokalisiert.

Betrieb A:

Der Zuchtbetrieb hat 1200 Sauen- und 4370 Läuferplätze. Im Abferkel- und Läuferbereich wurden seit 1971 nur Schweine gehalten. Das Gebäude, das den Zuchtläufer- und den Wartestall beherbergt, ist etwa 10 Jahre jünger. Die Zuchtsauen sind Kreuzungen aus Deutschem Landschwein, Deutschem Edelschwein und Leicoma, die Eber sind der Rasse Piétrain zugehörig. Die Abferkelung erfolgt in Kastenständen. Die Ferkel bleiben für 28 Tage bei der Sau. Das erste Ferkelfutter enthält Probiotika, nach dem Absetzen sind als Einstellungsprophylaxe Tetracyclin und Enteroxid (Colistinsulfat und Zinkoxid), eine Vitamingrundmischung sowie 0,5% organische Säuren dem mehlförmigen Futter für 14 Tage beigemischt. Das Sauenfutter ist hofeigen. Das Wasser stammt aus einem betriebseigenen Brunnen. Infektionen der Sauen und der Läufer werden in der Regel mit Amoxicillin, die der Ferkel mit Amoxicillin oder Enrofloxacin behandelt. Auf dem Gelände sind oft zwei streunende Katzen, die aber keinen Zugang zu den Ställen haben, zu beobachten. Der Ferkelerzeuger folgt einem strengen Hygieneregime, und die Stallungen sind sehr sauber.

Der Mastbetrieb hat 1680 Mastplätze. Das Gebäude wurde Mitte der siebziger Jahre errichtet und bis 1990 zur Rinderhaltung genutzt. Nachdem es dann etwa 3 Jahre leer stand, wurde es für die Schweinemast umgebaut. Die Gruppengröße liegt bei 20 Tieren, die Haltung erfolgt auf Spaltenböden. Eine Einstellungsprophylaxe erfolgt mit Tetracyclin-HCL, Trimethoprim-Diazin und Tylosinphosphat über 14 Tage. Auch hier werden Erkrankungen mit Amoxicillin und Enrofloxacin behandelt. Das Futter wird zugekauft, in der Vormast werden Probiotika zugesetzt. Das Wasser stammt auch hier aus einem Brunnen. Der Mastbetrieb bezieht seine Tiere ausschließlich vom oben beschriebenen Ferkelerzeuger. Die Stallbelegung erfolgt nach dem „Alles-rein-alles-raus-Prinzip“. Schadnager werden 1-2mal jährlich vom Schädlingsbekämpfer, ansonsten mit Rattengift bekämpft. Insgesamt aber macht der Mastbetrieb einen unsauberen und weniger gepflegten Eindruck.

Betrieb B:

Dieser Ferkelerzeuger hat 300 Sauen- und 1200 Läuferplätze. Die Sauenrasse ist Deutsches Landschwein x Deutsches Edelschwein x Duroc, als Vatertiere werden Eber der Rasse Piétrain genutzt. Im Abferkel- und Besamungsstall sind Kastenstände zu finden, der Wartestall ist ein Laufstall. Hier ist anzumerken, dass die

Sauen beliebig viel Freigang haben, da an diesen Stall mit Stroh eingestreute, nicht überdachte Paddocks angeschlossen sind. Alle Gebäude werden bereits seit Anfang der siebziger Jahre zur Schweinehaltung genutzt. Die durchschnittliche Säugezeit beträgt 21 Tage. Sauen und Läufer werden mit hofeigenem Futter gefüttert. Das Wasser stammt aus einem Brunnen. Bei Einstallung in den Läuferstall erfolgt eine Einstallungsprophylaxe mit Lincospectin premix (Lincomycin/Spectinomycin) über sieben Tage, des Weiteren ist dem Futter Ameisensäure beigemischt. Bakterielle Infektionen der Ferkel werden mit Enrofloxacin behandelt. Auf dem Betriebsgelände werden außer Schweinen auch noch Rinder gehalten. Schadnager werden regelmäßig bekämpft.

Die Mast der Schweine ist an drei Orten möglich: auf dem selben Betriebsgelände befinden sich 300 Mastplätze (Maststall A), in einem Nachbardorf sind 400 Mastplätze (Maststall B) vorhanden, die ebenfalls zu diesem Betrieb gehören. Die dritte Möglichkeit ist der Verkauf der Läufer in Maststall C, der ca. 50km entfernt liegt und 900 Mastplätze hat. Die hier durchgeführten Untersuchungen fanden in Maststall B und C statt. Hier werden die Läufer in Gruppen auf Spaltenböden gehalten. Die Belegung der Ställe erfolgt nach dem Alles-rein-alles-raus-Prinzip. Die Tiere werden nur von dem oben beschriebenen Ferkelerzeuger bezogen. Beide Mastställe verabreichen den Schweinen eine Einstallungsprophylaxe. Im Maststall B, der seit Anfang der achtziger Jahre zur Schweinehaltung genutzt wird, wurde dem ersten Versuchsdurchgang Trimethoprim/Sulfadiazin und dem zweiten Versuchsdurchgang Chlortetracyclin/Sulfadimidin über 14 Tage verabreicht. Die Schweine im Maststall C bekamen über 7 Tage Tylosin. Das Gebäude des Maststalles C wurde Anfang der siebziger Jahre errichtet und dient seitdem ausschließlich der Schweinemast. Das Wasser im Maststall B stammt aus einem Brunnen, das Futter wird zugekauft. Maststall C nutzt Leitungswasser und hofeigenes Futter.

Betrieb C:

Wie bei Betrieb A handelt es sich hier um einen relativ großen Betrieb mit 1000 Sauen- und 3200 Läuferplätzen. Die Gebäude wurden in den sechziger Jahren zur Schweinehaltung erbaut. Die Sauenrasse ist Deutsches Landschwein x Deutsches Edelschwein, Vatertiere sind der Rasse Deutsches Landschwein oder Deutsches Edelschwein zugehörig. Auch hier stehen die Sauen im Besamungs- und Abferkelstall in Einzelständen (Bügel), im Wartebereich werden sie in Gruppen gehalten. Das Absetzen der Ferkel erfolgt nach 21 Tagen. Den Läufern wird als Einstallungsprophylaxe Enteroxid (Colistinsulfat und Zinkoxid) über elf Tage verabreicht. Das Futter für Ferkel, Sauen und Läufer wird zugekauft. Dem Läuferfutter sind organische Säuren und Probiotika zugesetzt. Das Tränkwasser stammt aus einem Brunnen. Infektionen der Saugferkel werden in der Regel mit Duphamox[®], die der Läufer mit Tetracyclin behandelt. Die Schadnager auf dem Gelände werden mit betriebseigenen Katzen bekämpft, die allerdings keinen Zugang zu den Stallungen haben. Auf dem Betriebsgelände werden auch noch Schafe gehalten.

Der Mastbetrieb, der seine Schweine ausschließlich von dem eben beschriebenen Ferkelerzeuger bezieht, hat 7200 Mastplätze. Das Gebäude, welches 1973 errichtet wurde und seither nur der Schweinehaltung dient, ist

in 10 Ställe unterteilt, diese wiederum in Buchten. Pro Stall werden etwa 660 Tiere auf Spaltenboden gehalten. Die Belegung der Ställe erfolgt nach dem „Alles-rein-alles-raus-Prinzip“. Eine Einstallungsprophylaxe im Mastbereich wird nicht durchgeführt. Das Futter stammt aus eigener Produktion, das Wasser aus einem Brunnen. Infektionen werden mit Tiamutin, Tetracyclin und Amoxicillin behandelt. Eine Schadnagerbekämpfung wird mit Rattengift durchgeführt.

Betrieb D (Ökobetrieb):

Die Haltung der Sauen, Ferkel und Läufer erfolgt auf einem doppelt eingezäunten, 32 ha großen Freigelände. Dieses Areal steht seit sieben Jahren für die Schweinehaltung zur Verfügung. Zuvor wurde es ackerbaulich genutzt und zwischenzeitlich lag es fünf Jahre lang brach. Für die insgesamt 300 Sauen stehen 14 große und 26 kleine Hütten im Wartebereich sowie 75 Hütten im Abferkelbereich zur Verfügung. Die Zuchtsauen sind Kreuzungen aus Deutschem Landschwein und Deutschem Edelschwein, als Vatertiere werden acht Duroc-Eber genutzt. Die Ferkel bleiben fünf Wochen bei der Sau, dann werden sie in kleineren Gruppen (ca. 40 Tiere) in den Läuferbereich, der 23 Hütten mit angeschlossenen Paddocks umfasst, umgestellt. Zur Wasserversorgung steht ein eigener Brunnen mit Grander-Technik (www.grander.com) bereit. Das Futter wird ausschließlich zugekauft. Bakteriell bedingte Infektionen der Sauen werden mit Hostamox[®] behandelt, ansonsten werden bei Bedarf homöopathische Arzneimittel (z.B. Arnika, Lachesis) eingesetzt. Calcium carbonicum wird in regelmäßigen Abständen allen Tieren verabreicht und soll zur Entwurmung und als Immunstimulanz dienen. Ein Hund des Besitzers ist ständig auf dem Gelände. Füchse wurden, trotz Fuchsfängers im Außenzaun, auch schon auf dem Gelände gesichtet. Vögel haben freien Zugang. Nach Aussage des Besitzers sind vor allem Kolkraben, Fischreiher und Stare zu beobachten. Im Alter von etwa 10 Wochen werden die Läufer an verschiedene Mastbetriebe verkauft.

Der hier untersuchte Mastbetrieb befindet sich in Sachsen und betreibt neben der Mast unter ökologischen Produktionsbedingungen auch konventionelle Schweinezucht und -mast sowie Rinderhaltung. Der Betrieb hat insgesamt 1200 Schweinemastplätze, die sich alle in einem Gebäude befinden. Dieses Gebäude wurde 2002 errichtet. Bevor es für die Schweinemast genutzt wurde, fand darin ein Durchgang Rindermast statt. Das Gebäude ist in acht Abteile unterteilt. In den Abteilen stehen jeweils ca. 150-160 Tiere in einer Gruppe. In dem Gebäude erfolgt sowohl die konventionelle als auch die ökologische Mast. Die Ökotierte werden vom oben beschriebenen Ferkelerzeuger und einem zweiten Ferkelerzeuger bezogen. Die Tiere stehen auf Stroh. Entmistet, gereinigt und desinfiziert wird nach Ende der Vormast und nach Ende der Mast. Die Belegung erfolgt abteilweise nach dem „Alles-rein-alles-raus-Prinzip“. Die Tiere werden mit Brunnenwasser getränkt. Das Futter stammt sowohl aus eigener Produktion als auch aus Zukauf. Erkrankungen der Atemwege und Gelenke werden mit Cobactan[®] behandelt. Das Personal betreut gleichzeitig Rinder und Schweine. Schadnager werden mit cumarinhaltigen Präparaten bekämpft. Auch hier lebt ein Hund auf dem Betriebsgelände, der aber keinen Zugang zum Stall hat.

3.1.2 Probennahme

3.1.2.1 Probennahme in den Betrieben

Um das Vorkommen von *Y. enterocolitica* und *Campylobacter* spp. in Schweinebeständen zu untersuchen, wurden in jedem der Betriebe zufällig 100 Ferkel im Alter von ca. vier Tagen ausgewählt und mit Hilfe fortlaufend nummerierter Ohrmarken gekennzeichnet. Mittels steriler Wattetupfer wurden den Tieren mit den Ohrmarken 1-40 zwei Kotproben für die Untersuchungen auf *Campylobacter* spp. und *Y. enterocolitica* rektal entnommen. Ab Ohrmarke 41 wurde nur eine Probe für die Untersuchung auf *Y. enterocolitica* genommen. Die Wattetupfer wurden in gekennzeichnete, verschließbare, sterile Reagenzröhrchen gebracht. Das Ende des Tupfers, welches mit der Hand des Probennehmers in Kontakt kam, wurde abgebrochen und verworfen. Im Ferkelalter wurden die Tiere zweimal untersucht: zum einen kurz nach der Geburt (ca. vierter LT; im Folgenden als Termin Ferkel 1 bezeichnet), zum anderen kurz vor dem Umstallen in den Läuferbereich (ca. 18. LT in den Betrieben B und C, 25. LT Betrieb A, 32. LT Betrieb D; Termin Ferkel 2). Die Muttersauen der untersuchten Ferkel der Betriebe A-C wurden zu diesen Terminen ebenfalls beprobt. In Betrieb D war eine Beprobung der Sauen aufgrund der Haltungsform nicht möglich. Eine Untersuchung im Läuferstall wurde kurz vor dem Umstallen in den Maststall (ca. 10. LW; Termin Läufer) durchgeführt. Im Mastbereich fanden zweimal Probennahmen zur Untersuchung auf *Y. enterocolitica* (Ende erstes und Ende zweites Drittel der Mast; Termin Mast 1 und Mast 2) statt. Auf *Campylobacter* spp. wurden die Tiere im Mastbereich nur einmalig untersucht (Ende erstes Mastdrittel). Um die Gefahr des Ohrmarkenverlustes auf dem Schlachthof zu minimieren, wurden die Tiere beim zweiten Mastuntersuchungstermin erneut mit einer Ohrmarke gekennzeichnet. In regelmäßigen Abständen wurden zum Zeitpunkt der Tierbeprobung auch Umgebungsproben untersucht. Zur Probennahme wurden Wattetupfer mit PBS befeuchtet. Verschiedene Oberflächen (Trennwände, Heizlüfter, Fensterbänke, Rohrleitungen) im Stall wurden mit den Tupfern unter Zuhilfenahme einer Schablone auf einer Fläche von ca. 100 cm² abgewischt. Bei Nippeltränken wurde die Innenseite des Mundstücks betupft, bei Trogtränken (Betrieb D) wurde mit dem Tupfer auf dem Tränkenboden gewischt. Insekten wurden mit Hilfe eines über zwei Stöcke gespannten Tuches gefangen und anschließend in ein Gefäß verbracht. Zum Teil gelangten auch in den Ställen gefundene verendete Mäuse zur Untersuchung. Im Betrieb C, der Katzen zur Rattenbekämpfung nutzt, wurde auch von den Katzen ein Rektaltupfer genommen und untersucht. Des Weiteren wurden Oberflächentupferproben auch nach Reinigung und Desinfektion der Ställe genommen. Die Proben wurden nach der Entnahme unverzüglich zur Untersuchung in das Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig transportiert und weiterbearbeitet. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die untersuchten Umgebungsproben.

Tab. 9: Übersicht über Art und Anzahl genommener Umgebungsproben aller vier Betriebe auf *Y. enterocolitica* und *Campylobacter* spp.

	Probenanzahl			
	Betrieb A	Betrieb B	Betrieb C	Betrieb D
Nippeltränken	30	45	4	18
Futtertrog/-rohr	30	45	4	12
Wassertrog	-	-	-	3
Staub	26	34	4	14
Katzenkot	-	-	2	-
Schadnager	-	4	-	-
Insekten	18	27	2	12
Lüftungsöffnungen	6	8	2	-
Maststall nach R+D	30	50	-	10
Brunnenwasser	-	10	-	-
Schwalbenkot	-	8	-	-
gesamt	140	231	18	69

R+D Reinigung und Desinfektion

3.1.2.2 Probennahme auf dem Schlachthof

Die hier untersuchten Schweine wurden in zwei verschiedenen Schlachthöfen geschlachtet. Die Tiere der Betriebe A-C gelangten zum Schlachtbetrieb 1, die Ökotierte des Betriebes D wurden in Schlachtbetrieb 2 verbracht. Damit an jeder Probennahme-position die eindeutige Zuordnung der Tiere gewährleistet werden konnte, wurden die ersten beiden Tiere der gekennzeichneten Charge nach der Betäubung zusätzlich mit zwei Längsschnitten in jedem Vorderfuß markiert. So konnten auch an der letzten Position, wo die Ohren bereits abgesetzt waren, die Tiere eindeutig wiedererkannt werden. Die Zuordnung war über das Mitschreiben der Ohrmarkennummern möglich. Die Entnahme der Kotproben erfolgte am Beginn der weißen Schlachtstrecke, unmittelbar vor dem „Bung dropper“ im Schlachthof 1, im Schlachthof 2 wurde sie im schwarzen Bereich nach dem Brühen entnommen. Die Tupfer wurden, wie bereits unter 3.1.2.1 beschrieben, in sterile Röhrchen verbracht. Sowohl die Darmbeinlymphknoten als auch die Tonsillen wurden vom Schlachtpersonal entnommen und in bereitgehaltene gekennzeichnete Gefäße gegeben. Tupferproben von der Tierkörperoberfläche wurden mit sterilen, PBS-befeuchteten Wattetupfern genommen und ebenfalls in gekennzeichnete sterile Röhrchen verbracht. Getupfert wurde im Brust-Bauch-Bereich auf der Innen- und Außenseite. Das Betupfern einer definiert großen Stelle mittels einer Schablone war aufgrund der hohen Bandgeschwindigkeit nicht durchführbar. Am Tage nach der Schlachtung wurden unmittelbar vor der Zerlegung der gekühlten Schweine erneut Tupferproben von der Tierkörperoberfläche genommen. In dem

Zerlegebereich wurden Teilstücke von beliebigen Schweinen betupfert. Des Weiteren wurden Umgebungsproben (Tische, Messer, Fließbänder, Sägen, Kisten, Fußböden, Schuhsohlen des Personals) mit Wattetupfern und, wenn möglich, unter Zuhilfenahme einer Schablone genommen.

3.2 Methoden

3.2.1 *Yersinia enterocolitica*

3.2.1.1 Probenaufbereitung und Isolierung

Den in Reagenzröhrchen befindlichen Tupferproben wurde jeweils 9 ml ITC (Irgasan-Ticarcillin-Kaliumchlorat)-Bouillon zugegeben. Anschließend wurden sie gründlich mit Hilfe des Vortexers durchmischt. Die Organproben wurden abgeflammt, mit steriler Schere und Pinzette zerkleinert, in sterile Stomacherbeutel gegeben und mit der zehnfachen Menge ITC-Bouillon aufgefüllt. Die Proben wurden im Stomacher für eine Minute bei mittlerer Geschwindigkeit weiter zerkleinert und durchmischt. Den verendeten Mäusen wurde der Magen-Darm-Trakt mittels steriler Schere und Pinzette entnommen und eröffnet. Dann wurde er ebenfalls in Stomacherbeutel gegeben und wie eben beschrieben weiterbehandelt. Jeweils drei Wasserproben von je 100 ml wurden zu einer Probe gepoolt. Hiervon wurden 20 ml in 180 ml ITC-Bouillon gegeben und durchmischt. Die Anreicherung wurde für 48 h bei 28°C inkubiert. Von der Anreicherung wurde eine Öse voll auf CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin)-Agar ausgestrichen und für 24 h bei 28°C bebrütet. Einzelkolonien, welche die typische „Kuhaugen-Morphologie“ zeigten, wurden auf dem unspezifischen Müller-Hinton-Agar subkultiviert. Die Bebrütung erfolgte auch hier über 24 h bei 28°C.

3.2.1.2 Identifizierung

Die Identifizierung der Spezies *Yersinia enterocolitica* wurde mit Hilfe der PCR durchgeführt. Hierbei kam ein Protokoll zur Anwendung, welches das *ail*-Gen vervielfältigt. Dieses chromosomale Gen wird nur bei *Y. enterocolitica*-Serotypen gefunden, die mit Humanerkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (MILLER et al. 1989).

DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde ein handelsüblicher DNA-Purification Kit (Firma amersham pharmacia biotech) verwendet. Die Reinheit der DNA wurde im Spektralphotometer bestimmt. Liegt der Quotient der Absorption bei 260nm und 280nm zwischen 1,7 und 1,9, ist die DNA gut gereinigt. Die DNA-Konzentration der hier extrahierten Proben liegt bei etwa 0,04 µg/µl.

PCR

Diese PCR-Methode, modifiziert nach FENWICK und MURRAY (1991), amplifiziert ein 170 bp großes Fragment. Folgende Primer kamen dabei zum Einsatz:

Primer	Primer-Sequenz	Quelle
Ail-F1	5'-ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG-3'	FENWICK und MURRAY (1991)
Ail-R2	5'-CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG-3'	

Für den PCR-Ansatz wurde ein Mastermix verwendet, der bereits alle für die PCR notwendigen Komponenten enthält. 45µl des Mixes sind wie folgt zusammengesetzt:

1,25 U	Taq DNA-Polymerase
75mM	Tris-HCL (pH 8,8 bei 25°C)
20mM	(NH ₄) ₂ SO
1,5mM	MgCl ₂
0,01%	Tween [®] 20
0,2mM	jeweils von dATP, dCTP, dGTP und dTTP
Fällungsmittel und roter Farbstoff für die Elektrophorese	

Für eine PCR-Reaktion wurden folgende Volumina genutzt:

Mastermix	20 µl
Primer Ail-F1(100 pmol/µl)	0,12 µl
Primer Ail-R2(100 pmol/µl)	0,12 µl
Template-DNA	1,5 µl

Mastermix und Primer wurden entsprechend der Probenanzahl gemischt. Jeweils 20 µl dieses Mixes wurden pro Reaktion in PCR-Reaktionstubes pipettiert. Anschließend wurde das Template zugegeben. Zur Überprüfung der Reaktion wurde immer eine Positiv- (DSMZ 13030), eine Negativkontrolle (*Escherichia coli*) und eine no template control (NTC; Aqua bidest.) mitgeführt. Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab: Eine einmalige Denaturierung der DNA wurde bei 95°C für 5 min durchgeführt. Es folgten 30 Zyklen, die jeweils die Denaturierung bei 94°C für 30 sec, das Primer-Annealing bei 57°C für 30 sec und die Elongation bei 70°C für 1 min beinhalteten. Abgeschlossen wurde die PCR mit einer finalen Elongation bei 70°C für 10 min. Danach erfolgte die Analyse der DNA-Fragmente mittels horizontaler Gelelektrophorese in 1x TBE. Hierfür wurde ein 2,0%iges Agarose-Gel genutzt. Neben den Proben wurden auch Positiv-, Negativkontrolle und NTC sowie Längenmarker auf das Gel aufgetragen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit der DNA-anfärbenden Lösung Gelstar vermischt. Wenn das *ail*-Gen

vorhanden war, war nach der eineinhalbstündigen Elektrophorese bei 100V unter UV-Licht ein 170 bp großes Fragment vorhanden. Die so identifizierten Stämme wurden in Cryoröhrchen eingefroren und standen somit weiterführenden Untersuchungen zur Verfügung.

3.2.1.3 Weiterführende Untersuchungen

3.2.1.3.1 Serotypisierung

Auf einem Objektträger wurde von einer Reinkultur etwas Bakterienmasse in einen Tropfen des monospezifischen Testserums „Anti-*Y. enterocolitica* O:3“ eingegeben. Danach wurde der Objektträger bis zu 20 mal geschwenkt. Eine positive Reaktion in Form einer Agglutination trat zumeist bereits nach etwa vier-bis fünfmaligem Schwenken auf. Um eine Spontanagglutination auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle mit 0,9%iger NaCl-Lösung mitgeführt. Blieb eine Agglutination mit diesem Testserum aus, wurde der Test mit Seren gegen O:5 und O:9 wiederholt.

3.2.1.3.2 Biotypisierung

In Tabelle 10 sind die in dieser Arbeit untersuchten Parameter aufgeführt, die eine Differenzierung der Biotypen ermöglichen.

Tab. 10: Parameter zur Biotypisierung von *Y. enterocolitica*

Parameter	Biotyp					
	1A	1B	2	3	4	5
Salicin	+	-	-	-	-	-
Lipase (Tween Esterase)	+	+	-	-	-	-
Indol	+	+	+	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	-
NO ₃ Reduktion	+	+	+	+	+	-

+ positiv
- negativ

Zum Nachweis der Fermentation von Salicin und Xylose wurde eine Öse der Reinkultur in ein Fermentationsmedium gegeben, welches das entsprechende Kohlenhydrat enthält. Die Bebrütung erfolgte über 24 h bei 28°C. Eine positive Reaktion wird durch die Gelbfärbung des Mediums erkenntlich.

Der Lipase-Test erfolgte durch das linienförmige Ausstreichen auf Tween-Esterase-Agar. Nach der Bebrütung für 24 h bei 28°C ist, im positiven Falle, um den Impfstrich ein etwa 2 mm breiter Hof erkennbar.

Für den Indolnachweis wurde etwas Bakterienmasse in Tryptonwasser eingerührt und für 24 h bei 28°C bebrütet. Nach langsamer Überschichtung mit Kovács-Indolreagenz wird eine positive Reaktion durch die Bildung eines roten Ringes an der Oberfläche der Nährlösung sichtbar. Die Nitratreduktion wurde mit Hilfe einer Nitratboillon durchgeführt. Nach Einreiben der Bakterien in die Lösung und anschließender Bebrütung bei 28°C über 24 h wurden in das Röhrchen zuerst 150 µl Nitratreagenz A zugegeben und kurz geschwenkt. Danach erfolgte die Zugabe der gleichen Menge Nitratreagenz B. Im positiven Fall färbte sich die Lösung orange-rot.

3.2.1.3.3 Nachweis der Pathogenität

Für die Pathogenität sind sowohl chromosomal- als auch plasmid-kodierte Faktoren verantwortlich. Ein chromosomal codierter Pathogenitätsfaktor, das *ail*-Gen, wurde wie unter 3.2.1.2 beschrieben nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob die Isolate ein Plasmid tragen, wurde eine PCR durchgeführt, die ein plasmid-kodiertes Virulenzgen, das *yopT*, nachweist (ARNOLD et al. 2001). Dafür wurden folgende Primer genutzt:

Primer	Primer-Sequenz	Quelle
yopT-fw1	5'-TAT GTG CAC ATT GGA TTT-3'	ARNOLD et al. 2001
yopT-r1	5'-AAT GAT ACA TAG AAT TTT-3'	

Die PCR fand unter Nutzung des unter 3.2.1.2 beschriebenen Mastermixes statt. Für eine PCR-Reaktion wurden folgende Volumina genutzt:

Mastermix	20 µl
Primer yopT-fw1(100 pmol/µl)	0,12 µl
Primer yopT-r1(100 pmol/µl)	0,12 µl
Template-DNA	1,5 µl

Die PCR lief unter folgenden Bedingungen: einer initialen Denaturierung über 5 min bei 94°C folgten 35 Zyklen, die jeweils aus einer einminütigen Denaturierung bei 94°C, einem Primerannealing für 40 sec bei 43°C und einer einminütigen Elongation bei 72°C bestanden. Die abschließende Elongation wurde über 10 min bei 72°C durchgeführt. Zur Überprüfung der Reaktion wurde immer eine plasmidtragende Positiv- (DSMZ 13030), eine Negativkontrolle (*Escherichia coli*) und eine NTC mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 1,5%igem Agarose-Gel. Beim Vorhandensein des Plasmids war ein 478 bp großes Fragment unter UV-Licht sichtbar.

3.2.1.4 Molekularbiologische Differenzierung von *Y. enterocolitica* mittels PFGE

Um in einem Bestand die genetische Diversität des Erregers zu untersuchen, wurde die PFGE genutzt. Hierbei kam ein Protokoll nach KLEMM et al. (2003) zur Anwendung.

1. Anzucht der Stämme

Die Stämme wurden aus den Cryoröhrchen entnommen und auf TS-Agar ausgestrichen. Danach erfolgte eine Bebrütung bei 37°C für 16-18 Stunden.

2. Zelllysis

Ein Teil der angewachsenen Kolonien wurde in 2 ml PIV-Puffer gelöst, auf McFarland-Standard 5 eingestellt und anschließend in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 1000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 750µl PIV resuspendiert und auf Eis gegeben. Anschließend wurden 0,5 ml der Bakteriensuspension mit 0,5 ml ca. 60°C warmer 2%iger InCert-Agarose gemischt. Die Mischung wurde in Tuberkulinspritzen, deren Vorderende abgeschnitten wurde, aufgezogen und mit Parafilm verschlossen. Anschließend wurden die Spritzen für mindestens eine halbe Stunde auf Eis gelagert. Danach wurde der erstarrte Inhalt der Spritzen mit einem Skalpell in drei Teile geschnitten und in Röhrchen mit 2 ml Lysis-Lösung verbracht. Die Röhrchen wurden 2 Stunden bei 37°C liegend im Schüttelwasserbad inkubiert.

3. Deproteinisierung

Die Röhrchen wurden kurz auf Eis gegeben, die Lysislösung abgesaugt und verworfen. Auf die Agarose-Blöcke wurden 2 ml ESP (EDTA-Sarkosin-Proteinase)-Lösung gegeben und für eine Stunde im Schüttelwasserbad bei 50°C liegend inkubiert.

4. Waschungen in TE

Das ESP wurde abpipettiert. Von einem Agaroseblock wurde ein etwa 1 mm dickes Scheibchen abgeschnitten und in ein Eppendorftube gegeben. Der Agaroseblock wurde zurück ins Röhrchen gegeben und mit frischem ESP aufgefüllt. Das Agarosescheibchen im Eppendorftube wurde zwei mal 15 min in 200µl 10x TE (Tris-EDTA) bei 37°C gewaschen. Anschließend wurden die Blöckchen mit 200 µl Pefabloc SC-Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert, um die Proteasen zu inaktivieren. Danach wurden die Scheibchen abermals zwei mal 15 min in 200µl 10x TE bei 37°C gewaschen.

5. Restriktionsverdau

Der mit den Restriktionsenzymen mitgelieferte 10x Reaktionspuffer wurde auf 1x verdünnt. Dem verdünnten Puffer wurde anteilig 1% 100x BSA zugegeben. Nach dem Abpipettieren der TE-Lösung wurde den Agarosescheibchen 100µl des Puffers zur Äquilibration zugegeben, und sie wurden für 20 min auf Eis

verbracht. Danach wurde der Puffer abgesaugt und 100µl Restriktionspuffer hinzugegeben. Dieser unterschied sich von dem eben beschriebenen Puffer nur durch den Zusatz des Restriktionsenzym *NotI*. Die Inkubation erfolgte für vier Stunden bei 37°C.

6. Gelherstellung, Elektrophorese, Färbung und Auswertung

Die Elektrophorese erfolgte in einem 1%igen Agarose-Gel. Als Puffer wurde 0,5x TBE genutzt. Dieser wurde in der Elektrophoresekammer auf 14°C heruntergekühlt. Das erstarrte Gel wurde in die Kammer eingebracht und einer eineinhalbstündigen Vorelektrophorese unterzogen. Nach deren Abschluß wurde das Gel wieder aus der Kammer genommen und mit den Proben, einem Längenmarker und einer Restriktionskontrolle bestückt. Die Slots wurden mit flüssiger Agarose verschlossen und das Gel nach deren Erstarren erneut in die Kammer eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte über 20 Stunden bei 200V, 100mA mit Pulszeiten von 1-18 sec.

Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel für eine Stunde in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und danach eine halbe Stunde gewässert. Anschließend wurde das Gel mit einer CCD-Kamera unter UV-Licht aufgenommen und am Computer nachbearbeitet. Das Dateiformat wurde in ein für die Auswertungssoftware lesbares Format (TIF, Tagged Image File) überführt und mit Hilfe dieser ausgewertet.

3.2.2 *Campylobacter* spp.

3.2.2.1 Probenaufbereitung und Isolierung

Die Behandlung der Proben erfolgte wie bereits unter 3.2.1.1 beschrieben, nur dass hier als Anreicherungsmedium Bolton-Bouillon genutzt wurde. Die Anreicherung wurde für 24 h bei 42°C inkubiert, danach erfolgte ein Ausstrich auf mCCDA-Nährboden. Die Platten wurden mikroaerob bei 42°C für 48 h bebrütet. Kolonien, die von ihrer Wuchsform her auf *Campylobacter* schließen ließen, wurden nochmals auf mCCDA subkultiviert und für 24 h bei 42°C bebrütet. Eine nächste Subkultivierung erfolgte auch hier auf Müller-Hinton-Agar, der bei gleichen Bedingungen subkultiviert wurde. Die so erhaltenen Reinkulturen wurden für die Identifizierung genutzt.

3.2.2.2 Identifizierung

Auch hier wurde für die Identifizierung die PCR genutzt. Begonnen wurde mit einer genusspezifischen PCR, die das GTPase-Gen amplifiziert. Die DNA-Extraktion wurde wie unter 3.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Für die PCR wurden folgende Primer genutzt:

Primer	Primer-Sequenz	Quelle
GTP 1.1	5'-GCC AAA TGT TGG iAA RTC -3'	VAN DOORN et al. (1997)
GTP 2.1	5'-ATC AAG CCC TCC iCT RTC-3'	

Auch hier wurde der unter 3.2.1.2 beschriebene Mastermix verwendet. Ebenso erfolgte der PCR-Ansatz wie oben beschrieben, nur unter Verwendung der Primer GTP 1.1 und GTP 2.1 (Konzentration 100 pmol/μl). Als Positivkontrollen wurden die Stämme *C. coli* CCUG 10939 und *C. jejuni* CCUG 10935 mitgeführt. *Y. enterocolitica* DSZM 13030 und eine NTC dienten als Negativkontrollen. Für die PCR wurde folgendes Amplifikationsschema angewandt: primäre Denaturierung für 2 min bei 94°C, gefolgt von 40 Zyklen, bestehend aus jeweils einer einminütigen Denaturierung bei 94°C, einem einminütigen Primerannealing bei 50°C und einer einminütigen Elongation bei 74°C. Abgeschlossen wurde mit einer finalen Elongation über 2 min bei 74°C. Die Elektrophorese wurde auf einem 2%igem Agarose-Gel wie unter 3.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Wenn es sich um *Campylobacter* spp. handelte, war nach Sichtbarmachen unter UV-Licht ein 153 bp großes Fragment zu identifizieren. Mit den positiven Proben wurde nun zuerst eine speziesspezifische *C. coli*-PCR durchgeführt, da aus der Literatur bekannt ist, dass Schweine zumeist diese Spezies beherbergen. Dabei kamen folgende Primer zum Einsatz:

Primer	Primer-Sequenz	Quelle
COL3	5'-AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG -3'	GONZALEZ et al. (1997)
MDCOL 2	5'-TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG-3'	

Diese Primer zielen auf einen *C. coli*-spezifischen Teil des *ceuE*-Gens ab. Dieses kodiert für ein Protein, das in den Siderophorentransport involviert ist. Das Gen kommt sowohl bei *C. jejuni* als auch bei *C. coli* vor, aber es unterscheidet sich bei den beiden Spezies in etwa 15%.

Auch hier wurde der selbe Mastermix wie unter 3.2.1.2 beschrieben genutzt. Ebenso erfolgte der PCR-Ansatz wie oben beschrieben, nur unter Nutzung der Primer COL3 und MDCOL2 (Konzentration 100 pmol/μl). Als Positivkontrolle wurde der Stamm *C. coli* CCUG 10939 mitgeführt. Als Negativkontrollen wurden *C. jejuni* CCUG 10935 sowie eine NTC genutzt. Die Amplifikation lief nach folgendem Schema ab: Einer primären Denaturierung bei 94°C für 5 min folgten 40 Zyklen, die jeweils eine einminütige Denaturierung bei 94°C, ein Primerannealing bei 52°C für 30 sec und eine einminütige Elongation bei 72°C beinhalteten. Die PCR wurde mit einer finalen fünfminütigen Elongation bei 72°C abgeschlossen. Die Elektrophorese wurde auf einem 1,5%igem Gel wie unter 3.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Wenn es sich um *C. coli* handelte, war ein 462 bp großes Fragment vorhanden. Im negativen Fall wurde eine zweite *C. jejuni*-spezifische PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

Primer	Primer-Sequenz	Quelle
Hip1a	5'-ATG ATG GCT TCT TCG GAT AG-3'	MARSHALL et al. (1999)
Hip2b	5'-GCT CCT ATG CTT ACA ACT GC-3'	

Diese PCR amplifiziert das *C. jejuni*-spezifische Hippurikase-Gen. Der Ansatz erfolgte mit dem selben Mastermix und den gleichen Volumina. Als Positivkontrolle wurde der Referenzstamm CCUG 10935 verwendet. Als Negativkontrollen dienten *C. coli* CCUG 10939 und eine NTC. Die PCR bestand aus einer primären Denaturierung bei 94°C für 5 min. Es folgten 30 Zyklen, die die Denaturierung (94°C, 30 sec), das Primeranrennen (60°C, 30 sec) und die Elongation (72°C, 1 min) umfassten. Eine abschließende Elongation wurde bei 72°C für 10 min durchgeführt. Die Gelelektrophorese zum Nachweis des 176 bp großen Fragments erfolgte mit Hilfe eines 2%igen Agarose-Gels. Mittels dieser PCR-Protokolle konnte die Spezieszugehörigkeit aller Isolate geklärt werden.

3.2.2.3 Molekularbiologische Differenzierung von *C. coli* mittels AFLP

Wenn aus den Umgebungsproben *C. coli* isoliert werden konnte, wurden diese Stämme mit den zeitgleich isolierten Schweine-*C.-coli*-Stämmen des Bestandes verglichen. Damit sollte untersucht werden, inwieweit die Umgebungsisolate mit den Schweineisolaten verwandt sind, um eventuelle Eintragsquellen zu klären. Dabei kam eine modifizierte Methode nach DUIM et al. (1999) sowie KOKOTOVIC und ON (1999) zur Anwendung. Die aus vier Schritten bestehende Methode wurde wie folgt durchgeführt:

1. Restriktionsverdau der DNA

Genutzte Enzyme und Erkennungssequenzen:	<i>HhaI</i>	5'-GCG▼C-3'
		3'-C▲GCG-5'
	<i>HindIII</i>	5'-A▼AGCTT-3'
		3'-TTCGA▲A-5'
Restriktionsansatz (pro Probe):	<i>HhaI</i> (20000U/ml)	0,2µl
	<i>HindIII</i> (10000U/ml)	0,2µl
	BSA (10mg/ml)	0,1µl
	NEBuffer2 10x	0,8µl
	Aqua bidest.	8,0µl
	Template-DNA	1,0µl

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2. Adapterligation

Genutzte Adapter und deren Sequenzen:	<i>Hhaad</i> 1	5'-GAC GAT GAG TCC TGA TCG-3'
	<i>Hhaad</i> 2	5'-ATC AGG ACT CAT CG-3'
	<i>Hindad</i> 1	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'
	<i>Hindad</i> 2	5'-AGC TGG TAC GCA GTC-3'

Ligationsansatz (pro Probe):	Restriktionsansatz (Schritt 1)	10,0µl
	Ligase (3U/µl)	0,4 µl
	Ligasepuffer 10x	1,2µl
	Aqua bidest.	10,4µl
	Adaptermix*	2,0µl

*Der Adaptermix ist aus jeweils einem Teil *Hindad* 1 und *Hindad* 2 und zu je zehn Teilen *Hhaad* 1 und *Hhaad* 2 zusammengesetzt. Alle Adapter hatten eine Konzentration von jeweils 100 pmol/µl.

Die Inkubation des Ansatzes erfolgt für zwei Stunden bei 37°C.

3. Präselektive PCR

Das Produkt aus Schritt 2 wurde mit 180 µl Aqua bidest. verdünnt. 4 µl der verdünnten Lösung wurden in ein neues Tubeplate pipettiert. Der PCR-Ansatz, von welchem 18µl zu den 4µl hinzupipettiert wurden, war wie folgt zusammengesetzt (pro Probe):

Mastermix	15µl
MgCl ₂ (25mM)	0,8µl
<i>Hhapre</i> (100 pmol/µl)	2,0µl
<i>Hindpre</i> (100 pmol/µl)	0,4µl

Genutzte Primer und deren Sequenzen:	<i>Hhapre</i>	5'-GAT GAG TCC TGA TCG C-3'
	<i>Hindpre</i>	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T-3'

Amplifikationsschema:	72°C	2 min	
	94°C	20 sec	} 20 Zyklen
	56°C	30 sec	
	72°C	2 min	

4. Selektive PCR

Das Produkt aus Schritt 3 wurde mit 180µl Aqua bidest. verdünnt. Davon wurde jeweils 4µl in ein neues Tubeplate pipettiert. Pro Probe wurden 18 µl dieses Mixes zugegeben:

Mastermix	15µl
MgCl ₂ (25mM)	0,8µl
<i>H</i> hasel (100 pmol/µl)	2,0µl
<i>H</i> indsel (100 pmol/µl)	0,4µl

Genutzte Primer und deren Sequenzen:	<i>H</i> hasel	5'-GAT GAG TCC TGA TCG CA-3'
	<i>H</i> indsel	5'-GAC TGC GTA CCA GCT TA-3'

Amplifikationsschema:	94°C	20 sec	}	10 Zyklen
	66°C	30 sec		
	72°C	2 min		
	94°C	20 sec	}	20 Zyklen
	56°C	30 sec		
	72°C	2 min		
	60°C	30 min		

Die so erhaltenen Amplifikate wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert. Danach erfolgte die Elektrophorese unter Nutzung eines 12,5%igen Polyacrylamidgels. Das Gel wurde auf der dünn mit Paraffinöl bestrichenen Elektrophoresekühlplatte auf 18°C vorgekühlt. Danach wurden die Proben, die Negativkontrolle und der Referenzstamm aufgetragen. Nach Aufbringen der Gelelektroden und Verschluss der Elektrophoresekammer wurden die DNA-Fragmente bei einer Stromstärke von 400 V in einem Zeitraum von 120 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe eines Silberfärbungskits gefärbt und unter Weißlicht betrachtet. Die Bandenmuster wurden mit einer CCD-Videokamera aufgenommen und mit Hilfe einer Dokumentationssoftware in ein für die Auswertungssoftware lesbares Dateiformat (TIF, Tagged Image File) überführt. Die Analyse der AFLP-Bandenmuster erfolgte mit Hilfe der Phoretix 1D Advanced Version 5.20- und Phoretix 1D Database Version 2.00-Software (beides Nonlinear Dynamics., Newcastle upon Tyne, UK). Dazu wurden nur die AFLP-Banden mit einer Molekulargröße im Bereich zwischen 34 bis 501 bp analysiert. Nach der Normalisierung und dem Abzug des Hintergrunds wurden die Banden gegen einen Referenzstandard verglichen. Ähnlichkeiten zwischen den Banden wurde unter Zuhilfenahme der Dice Koeffizienten berechnet. Zur eigentlichen Cluster-Analyse der AFLP-Profile fand der ungewichtete Paarvergleich (unweighed pair-group method using arithmetic averages [UPGMA]) Anwendung. Bei den folgenden Untersuchungen wurden Isolate, die eine Ähnlichkeit (cut-off) $\geq 90\%$ zeigten, als genetisch eng miteinander verwandt (klonal) angesehen und als ein Cluster bezeichnet.

3.2.3 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung der Verlaufsuntersuchungen wurde der Vorzeichentest genutzt. Die Überprüfung der Häufigkeiten erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson. Zur Datenauswertung wurde das Programm SPSS Version 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA) genutzt. Eine statistische Signifikanz lag vor, wenn $p < 0,05$.

Die Beschreibung aller verwendeten Geräte, Nährmedien und Gebrauchsgegenstände ist dem Anhang zu entnehmen.

4 Ergebnisse

4.1 *Yersinia enterocolitica*

4.1.1 Vorkommen in den Zucht- und Mastbetrieben

4.1.1.1 Kotproben

Betrieb A:

In diesem Betrieb fanden zwei Versuchsdurchgänge statt. In keiner der untersuchten Kotproben konnte *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Die genauen Untersuchungszahlen sind aus Tabelle 11 zu entnehmen.

Tab. 11: Ergebnisse der Untersuchungen von Kotproben auf *Y. enterocolitica* bei Schweinen des Betriebes A

Alter	n	Durchgang I		n	Durchgang II	
		positiv	positiv (%)		positiv	positiv (%)
Muttersauen	10	0	-	11	0	-
Ferkel 1	100	0	-	100	0	-
Muttersauen	10	0	-	11	0	-
Ferkel 2	96	0	-	99	0	-
Läufer	90	0	-	92	0	-
Mast 1	89	0	-	91	0	-
Mast 2	84	0	-	86	0	-
Schlachtung	50	0	-	45	0	-

n = Probenanzahl

Betrieb B:

Hier fanden drei Untersuchungsdurchgänge statt. Die ersten beiden Durchgänge wurden im Maststall B, der dritte im Maststall C durchgeführt. Bei Sauen, Ferkeln und Läufern konnte zu keinem Zeitpunkt der Erreger isoliert werden, aber im Maststall B gelang der Nachweis. Im ersten Durchgang war ein hochsignifikanter Anstieg vom Mast-1- zum Mast-2-Termin zu beobachten ($p < 0,0001$). Im zweiten Durchgang war vom Läufer- zum Mast-1-Termin ein signifikanter Anstieg zu beobachten ($p = 0,08$). In Tabelle 11 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Von den insgesamt 13 Schweinen (Durchgänge 1 und 2), die zum Zeitpunkt Mast 1 *Y. enterocolitica* ausschieden, war zum Zeitpunkt Mast 2 (etwa 8 Wochen später) nur noch ein einziges (7,7%) positiv. Auch zum Schlachtzeitpunkt schied nur noch ein Schwein den Erreger aus. Dieses

Tier war bereits zum Mast-2-Termin positiv, nicht jedoch zu Mast 1. Bei allen Isolaten handelte es sich um das humanpathogene Bioserovar 4/O:3. Die Prävalenzen zeigt Tabelle 12.

In diesem Betrieb wurden noch zusätzlich 35 Tonsillentupferproben von 7 Tage alten Ferkeln genommen. Zeitgleich wurde der Kot der fünf dazugehörigen Muttersauen untersucht. Ein Nachweis von *Y. enterocolitica* war nicht möglich.

Tab. 12: Ergebnisse der Untersuchungen von Kotproben auf *Y. enterocolitica* bei Schweinen des Betriebes B

	Durchgang I (Maststall B)			Durchgang II (Maststall B)			Durchgang III (Maststall C)		
	n	pos.	pos. (%)	n	pos.	pos. (%)	n	pos.	pos. (%)
MS	20	0	-	15	0	-	14	0	-
Ferkel 1	100	0	-	100	0	-	100	0	-
MS	20	0	-	15	0	-	14	0	-
Ferkel 2	96	0	-	98	0	-	98	0	-
Läufer	92	0	-	97	0	-	97	0	-
Mast 1	87	5	5,7	94	8	8,5	87	0	-
Mast 2	81	53	65,4	81	4	4,9	87	0	-
Schlachtung	71	1	1,4	62	0	-	72	0	-

MS= Muttersau pos.= positiv n= Probenanzahl

Betrieb C:

In diesem Betrieb konnte nur ein Durchgang untersucht werden. Auch hier gelang der Nachweis von *Y. enterocolitica* nur im Mastbereich. Die isolierten Stämme waren auch hier dem Bioserovar 4/O:3 zugehörig. Tabelle 13 fasst die Untersuchungszahlen und Nachweisraten zusammen. Wie im Betrieb B, Durchgang 1, war ein hochsignifikanter Anstieg vom Mast-1- zum Mast-2-Termin zu beobachten ($p < 0,0001$). Von den beiden Schweinen, die zum Zeitpunkt Mast 1 positiv waren, schied zum Zeitpunkt Mast 2 (8 Wochen später) nur noch ein Schwein (50%) den Erreger aus.

Tab. 13: Ergebnisse der Untersuchungen von Kotproben auf *Y. enterocolitica* bei Schweinen des Betriebes C

	n	positiv	positiv (%)
Muttersauen	23	0	-
Ferkel 1	100	0	-
Muttersauen	23	0	-
Ferkel 2	98	0	-
Läufer	91	0	-
Mast 1	90	2	2,2
Mast 2	81	39	48,2
Schlachtung	79	0	-

n= Probenanzahl

Betrieb D:

Wie in Betrieb C konnte auch hier nur ein Durchgang untersucht werden. Der Nachweis von *Y. enterocolitica* gelang wie im Betrieb A und im Maststall C des Betriebes B am lebenden Tier zu keinem Zeitpunkt. Aufgrund der längeren Mastdauer, verglichen mit konventioneller Haltung, wurden in diesem Betrieb während der Mast dreimal Proben genommen. Die Untersuchungszahlen fasst Tabelle 14 zusammen.

Tab. 14: Ergebnisse der Untersuchungen von Kotproben auf *Y. enterocolitica* bei Schweinen des Betriebes D:

	n	positiv	positiv (%)
Ferkel 1	100	0	-
Ferkel 2	93	0	-
Läufer	89	0	-
Mast 1	71	0	-
Mast 2	78	0	-
Mast 3	75	0	-
Schlachtung	60	1	1,7

n= Probenanzahl

4.1.1.2 Umgebungsproben

Einen Überblick über untersuchte Umgebungsproben gibt Tabelle 9. Aus keiner der 458 Proben konnte *Yersinia enterocolitica* isoliert werden.

4.1.2 Vorkommen zum Schlachtzeitpunkt

4.1.2.1 Kot, Tonsillen, Lymphknoten und Oberflächentupferproben

Betrieb A:

In keinem der beiden Untersuchungsdurchgänge war eine Isolierung im Stall möglich (siehe 4.1.1.1). Auf dem Schlachthof hingegen konnte der Erreger in beiden Durchgängen in den Tonsillen nachgewiesen werden. Die Isolate waren dem Bioserovar 4/O:3 zugehörig. Tabelle 15 zeigt Untersuchungszahlen und Ergebnisse.

Tab. 15: Vorkommen von *Y. enterocolitica* zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb A

	1. Durchgang			2. Durchgang		
	n	positiv	positiv (%)	n	positiv	positiv (%)
Kot	50	0	-	45	0	-
Tonsillen	50	4	8,0	45	7	15,6
Darmbein-LK	50	0	-	45	0	-
Tierkörperoberfläche v. K.	50	0	-	45	0	-
Tierkörperoberfläche n. K.	50	0	-	45	0	-

n= Probenanzahl

LK= Lymphknoten

v.k.= vor Kühlung

n.K.= nach Kühlung

Betrieb B:

Im ersten Versuchsdurchgang sind 75 Schweine zur Schlachtung gelangt, aber bei Kot, Tonsillen und Lymphknoten konnten nicht alle Proben genommen werden. Tabelle 16 zeigt die Probenzahlen und die Häufigkeiten der Isolierung von *Y. enterocolitica*.

Tab. 16: Vorkommen von *Y. enterocolitica* zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb B, Durchgang 1 (Maststall B)

	n	positiv	positiv (%)
Kot	71	1	1,4
Tonsillen	64	44	68,8
Darmbein-LK	38	1	2,6
Tierkörperoberfläche v. K.	75	0	-
Tierkörperoberfläche n. K.	75	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Die beiden Schweine, bei welchen der Erreger aus dem Lymphknoten bzw. aus dem Kot isoliert werden konnte, waren auch in den Tonsillen positiv. Vergleicht man das Vorkommen des Erregers im Kot zum Zeitpunkt Mast 2 mit dem Vorkommen in den Tonsillen zur Schlachtung, so kann festgestellt werden, dass bei etwa der Hälfte der Tiere (31 von 64; 48,4%) zu beiden Zeitpunkten der Erreger isoliert werden konnte. Bei 13 Tieren (20,3%) gelang die Isolierung nur aus den Tonsillen zur Schlachtung und bei 10 Tieren (15,6%) nur aus dem Kot zum Mast-2-Termin. Bei 10 weiteren Schweinen (15,6%) konnte der Erreger zu diesen beiden Zeitpunkten nicht nachgewiesen werden.

Von den fünf Schweinen, die zum Zeitpunkt Mast 1 den Erreger mit dem Kot ausschieden, sind vier zur Schlachtung gelangt. Bei drei Schweinen (75%) war der Erreger in den Tonsillen nachweisbar, beim vierten Schwein (25%) gelang keine Isolierung. Bei einem dieser Tiere war ein dreimaliger Erregernachweis (Kot Mast 1 und Mast 2 sowie Tonsille Schlachtung) möglich. Die Isolate gehörten dem Bioserovar 4/O:3 an.

Beim zweiten Durchgang waren die Ergebnisse ähnlich. Eine Vielzahl der Schweine trug auch hier *Y. enterocolitica* 4/O:3 in den Tonsillen. Tabelle 17 zeigt die Erregerprävalenz.

Tab. 17: Vorkommen von *Y. enterocolitica* zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb B, Durchgang 2 (Maststall B)

	n	positiv	positiv (%)
Kot	62	0	-
Tonsillen	62	39	62,9
Darmbein-LK	62	0	-
Tierkörperoberfläche v. K.	62	0	-
Tierkörperoberfläche n. K.	62	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Von den vier Schweinen, die zum Zeitpunkt Mast 2 den Erreger ausschieden, sind drei zur Schlachtung gelangt. Bei zwei dieser Tiere (66,7%) gelang der Erregernachweis in den Tonsillen. 37 der 39 (94,9%) Schweine, bei denen der Erreger in den Tonsillen nachweisbar war, hatten zum Mast-2-Termin einen negativen Kotbefund. Drei der acht Schweine, die zum Zeitpunkt Mast 1 positiv waren, konnten am Schlachthof beprobt werden. Bei allen (100%) war der Erreger in den Tonsillen nachweisbar.

Im dritten Durchgang, wo die Schweine in einem anderen Mastbetrieb gemästet worden waren und eine Isolierung im Betrieb nicht gelang, war auch auf dem Schlachthof die Prävalenz sehr gering. Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse. Die Isolate gehörten dem Bioserovar 4/O:3 an.

Tab. 18: Vorkommen von *Y. enterocolitica* zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb B, Durchgang 3 (Maststall C)

	n	positiv	positiv (%)
Kot	72	0	-
Tonsillen	72	4	5,6
Darmbein-LK	72	0	-
Tierkörperoberfläche v. K.	72	0	-
Tierkörperoberfläche n. K.	72	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Betrieb C:

Tabelle 19 zeigt die Prävalenz von *Y. enterocolitica* zum Zeitpunkt der Schlachtung im Betrieb C. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie in den ersten beiden Durchgängen des Betriebes B. Die Isolate waren dem Bioserovar 4/O:3 zugehörig.

Tab. 19: Vorkommen von *Y. enterocolitica* zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb C

	n	positiv	positiv (%)
Kot	79	0	-
Tonsillen	79	45	56,7
Darmbein-LK	43	3	7,0
Tierkörperoberfläche v. K.	79	1	1,3
Tierkörperoberfläche n. K.	79	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Bei den drei Schweinen, bei welchen eine Isolierung aus dem Lymphknoten möglich war, gelang ebenfalls der Nachweis in den Tonsillen. Zwei dieser Tiere (66,7%) schieden den Erreger zum Zeitpunkt Mast 2 mit dem Kot aus. Das eine Isolat von der Oberfläche stammte von einem Schwein, bei welchem der Erreger nicht in den Tonsillen nachweisbar war. Allerdings schied dieses Tier zum Zeitpunkt Mast 2 den Erreger aus. Bei 29 der 79 (36,7%) zum Schlachtzeitpunkt untersuchten Tiere war *Y. enterocolitica* sowohl zum Zeitpunkt Mast 2 im Kot als auch zur Schlachtung in den Tonsillen nachweisbar. 16 Schweine (20,3%) beherbergten den Erreger in den Tonsillen, obwohl er zuvor im Kot nicht nachgewiesen werden konnte. Nur im Kot zum Zeitpunkt Mast 2, aber nicht in den Tonsillen, wurde bei 8 Schweinen (10,1%) der Keim isoliert. Bei 26 Tieren (32,9%) gelang zu keinem Zeitpunkt der Nachweis.

Betrieb D:

Aus Tabelle 20 sind Untersuchungszahlen und -ergebnisse zu entnehmen. Dem Bioserovar 4/O:3 waren zwei Tonsillenisolate und das Kotisolat zugehörig. Das dritte Tonsillenisolat war Serovar O:9. Aufgrund der positiven Xylose-Reaktion ist es dem Biovar 3 zuzuordnen.

Tab. 20: Vorkommen von *Y. enterocolitica* zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb D

	n	positiv	positiv (%)
Kot	60	1	1,7
Tonsillen	60	3	5,0
Darmbein-LK	60	0	-
Tierkörperoberfläche v. K.	60	0	-
Tierkörperoberfläche n. K.	60	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten

v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

4.1.2.2 Umgebungsproben

Umgebungsproben wurden ausschließlich im Zerlegebereich nach der Kühlung genommen. In keiner der untersuchten Proben war der Erreger nachweisbar. Aus Tabelle 21 ist Art und Anzahl der genommenen Proben ersichtlich.

Tab. 21: Ergebnisse der Umgebungsprobenuntersuchungen auf dem Schlachthof auf *Y. enterocolitica*

Probenmaterial	n	davon positiv
Zerlegetische	47	0
Messer	19	0
Fließbänder	24	0
Sägen	22	0
Kisten	23	0
Fußboden	10	0
Schuhsohle Zerlegepersonal	10	0
Teilstücke zerlegter Schweine	24	0
gesamt	179	0

n= Probenanzahl

4.1.3 Prüfung der Pathogenität

In Tabelle 22 ist dargestellt, bei wieviel Stämmen zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt ein Virulenzplasmid mittels PCR nachgewiesen werden konnte.

Tab. 22: Übersicht über den Anteil plasmidtragender *Y. enterocolitica*-Stämme

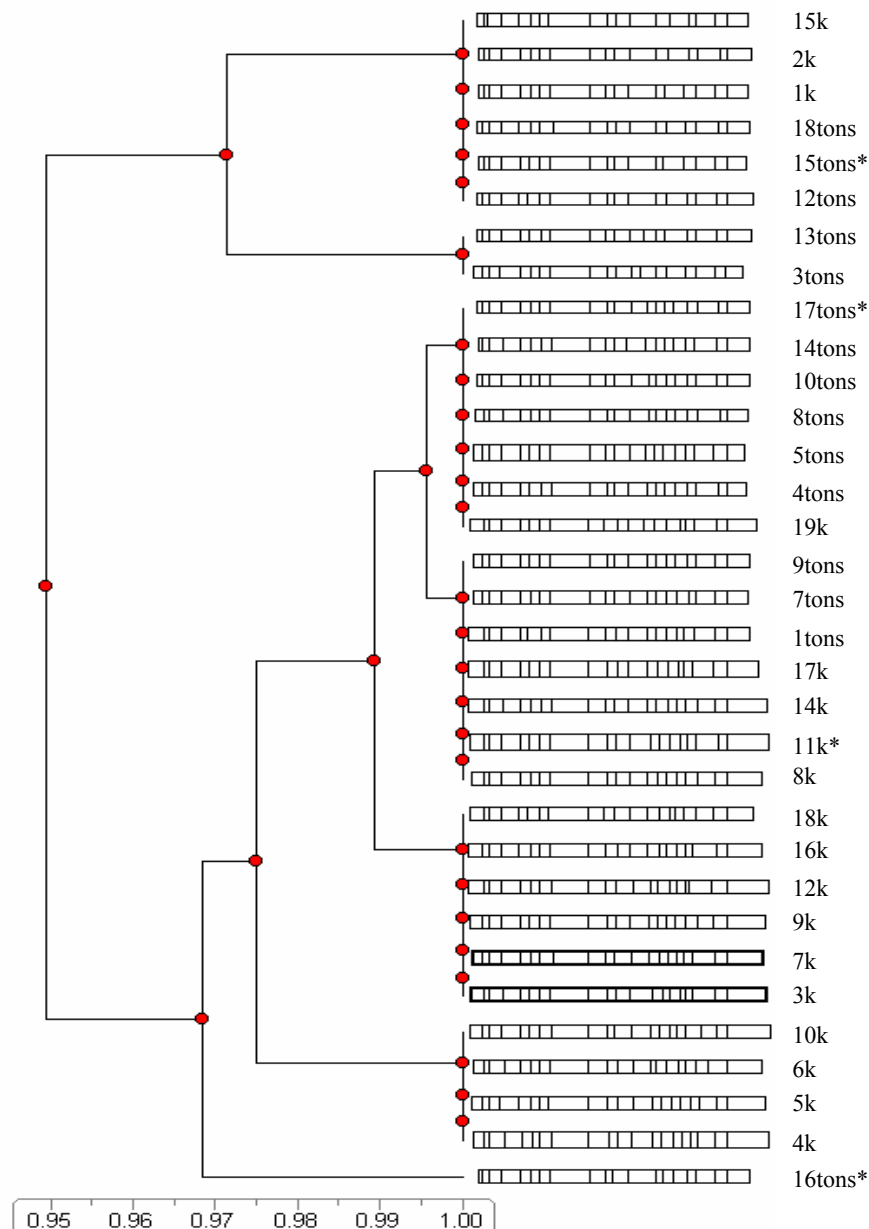
Betrieb	Durchgang	Zeitpunkt	n	<i>yopT</i> -positiv	<i>yopT</i> -positiv (%)
A	1	Mast	0	-	-
	1	Schlachtung	4	4	100
A	2	Mast	0	-	-
	2	Schlachtung	7	7	100
B	1	Mast	58	58	100
	1	Schlachtung	46	30	65,2
B	2	Mast	12	12	100
	2	Schlachtung	39	36	92,3
B	3	Mast	0	-	-
	3	Schlachtung	4	4	100
C	1	Mast	41	40	97,6
	1	Schlachtung	48	41	85,4
D	1	Mast	0	-	-
	1	Schlachtung	4	4	100

n= Anzahl isolierter *Y. enterocolitica*-Stämme

yopT= Genlokus auf Virulenzplasmid

4.1.4 Genotypisierung ausgewählter *Y. enterocolitica*-Isolate

In einem Bestand (Betrieb C) wurden Isolate, die aus dem Kot zum Zeitpunkt Mast 2 und aus den Tonsillen zum Zeitpunkt der Schlachtung von denselben Tieren gewonnen wurden, mit Hilfe der PFGE miteinander verglichen. Dabei war festzustellen, dass alle Isolate, egal ob aus Kot oder aus Tonsillen, einem Pulsotyp zugehörig waren (über 95% Homologie). Auch die plasmidlosen Stämme zeigten das gleiche Bandenmuster. In Abbildung 1 sind die Verwandtschaftsbeziehungen im Dendrogramm dargestellt.



k Kot tons Tonsillen * *yopT*-negativ Zahlen Tiernummern

Abb. 1: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse von *Y. enterocolitica*-Stämmen aus Kot zum Zeitpunkt Mast 2 und aus Tonsillen zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb C

4.2 *Campylobacter*

4.2.1 Vorkommen in den Zucht- und Mastbetrieben

4.2.1.1 Kotproben

Betrieb A:

Im ersten Versuchsdurchgang konnte zu keiner Zeit der Erreger nachgewiesen werden. Tabelle 23 zeigt die Untersuchungszahlen. Ab dem Läuferalter wurde aufgrund der negativen Untersuchungsergebnisse die Probenzahl erhöht. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt der Läuferuntersuchung noch jeweils sechs Sammelkotproben aus jedem der vier Stallabteile genommen. Auch aus diesen Proben gelang kein Erregernachweis.

Zum Beginn des zweiten Durchganges verhielt es sich ähnlich, die Kotproben der Ferkel und ihrer Muttersauen waren negativ. Aber ab dem Läuferalter war der Nachweis des Erregers möglich. Das Tier, welches zum Termin Mast 1 positiv getestet wurde, war nicht dasselbe wie im Läuferalter. Zum zweiten Mastuntersuchungstermin war das im Läuferalter positiv getestete Tier abermals positiv, die übrigen acht Schweine schieden den Erreger erstmalig aus. Alle Isolate konnten als *C.coli* identifiziert werden. Auch hier sind die genauen Untersuchungszahlen und -ergebnisse aus Tabelle 23 zu entnehmen.

Tab. 23: Ergebnisse der Untersuchungen von Kotproben auf *Campylobacter* spp. bei Schweinen des Betriebes A

Alter	n	Durchgang 1		n	Durchgang 2	
		positiv	positiv (%)		positiv	positiv (%)
Muttersauen	4	0	-	6	0	-
Ferkel 1	40	0	-	60	0	-
Muttersauen	4	0	-	6	0	-
Ferkel 2	40	0	-	59	0	-
Läufer	54	0	-	54	1	1,9
Sammelkot	24	0	-	n.u.	-	-
Mast 1	54	0	-	53	1	1,9
Mast 2	n.u.	-	-	52	9	17,3
Schlachtung	50	2	4	45	3	6,7

n.u.= nicht untersucht n= Probenanzahl

Betrieb B:

Im ersten Durchgang stammten die 40 untersuchten Ferkel von acht Muttersauen. Bei fünf der acht Sauen wurde der Erreger zwei Mal nachgewiesen, bei zwei weiteren einmalig, und bei einer Sau war kein Nachweis möglich. Zum ersten Untersuchungstermin waren alle Ferkel der negativen Sau negativ, alle anderen Sauen hatten mindestens ein positives Ferkel. Bei einer zweimal positiv getesteten Sau waren sogar bereits zu diesem Termin alle Ferkel positiv. Beim Ferkel-2-Termin waren drei Würfe von zweimal positiv getesteten Sauen komplett durchseucht, ein Ferkel der negativen Sau schied ebenso den Erreger aus. Zu diesem Zeitpunkt war die Durchseuchung am höchsten, über das Läuferalter bis hin zur Mast ging sie zurück. Elf der 24 Tiere (45,8%), die bis zur Schlachtung untersucht werden konnten, schieden den Erreger kontinuierlich aus. Als kontinuierliche Ausscheider wurden die Schweine bezeichnet, bei denen der Erreger nach erstmaliger Ausscheidung bei jeder Probennahme inklusive Schlachtung nachweisbar war. Alle Isolate waren der Spezies *C. coli* zugehörig. Ein signifikanter Anstieg der Nachweishäufigkeit war vom Ferkel-1- zum Ferkel-2- Termin zu beobachten ($p = 0,035$).

Auch im zweiten Untersuchungsdurchgang war der Erregernachweis in allen Altersstufen möglich. Vier der fünf Muttersauen schieden den Erreger zu beiden Untersuchungszeitpunkten aus, die fünfte Sau wurde zweimal als negativ getestet. Zum ersten Untersuchungstermin hatte jede Sau mindestens ein positives Ferkel, die negative Sau sogar zwei. Zum zweiten Termin, kurz vor dem Absetzen, waren von zwei positiven Sauen alle Ferkel positiv, von den beiden anderen positiven Sauen schieden alle untersuchten Ferkel bis auf je eines den Erreger aus. Die negative Sau hatte auch hier zwei positive Ferkel. Eines dieser Ferkel war bereits beim ersten Termin positiv, das andere hatte sich neu infiziert. Im Läuferstall war die Durchseuchung ähnlich hoch. In der Mast ging sie dann um ca. 14% zurück. Insgesamt sind 23 Schweine, die permanent auf *Campylobacter* spp. untersucht wurden, zur Schlachtung gelangt. 13 dieser Schweine schieden den Erreger kontinuierlich aus (56,5%), die übrigen 10 Tiere (43,5%) waren intermittierende Ausscheider. Alle aus dem Kot isolierten Stämme konnten als *C. coli* identifiziert werden. Auch in diesem Durchgang war ein signifikanter Anstieg der Nachweishäufigkeit vom Ferkel-1- zum Ferkel-2- Termin zu beobachten ($p = 0,006$).

Im dritten Durchgang konnten die Sauen nur einmalig beprobt werden. Auch hier schieden vier der fünf untersuchten Muttersauen den Erreger aus. Alle positiven Sauen hatten zum ersten Untersuchungstermin mindestens zwei positive Ferkel, bei der negativen Sau war nur eines Erregerausscheider. Die zweite Untersuchung (Ferkel 2) war erst im Läuferstall, und zwar sechs Tage nach dem Absetzen, möglich. Zu diesem Zeitpunkt bekamen die Schweine eine Einstellungsprophylaxe. Es konnte lediglich bei drei Tieren der Erreger gefunden werden. Zwei dieser Ferkel waren bereits bei der ersten Beprobung positiv. Aufgrund dieser geringen Nachweisrate wurden die Tiere nach drei Wochen vorzeitig beprobt (Läufer 1). Bei dieser Untersuchung zeigte sich dann ein zu erwartendes Ergebnis, die Prävalenz lag bei 76,9%. Im Maststall war wiederum ein leichter Rückgang um ca. 8% zu beobachten. Von den 40 permanent auf *Campylobacter* spp. untersuchten Tieren sind 30 zur Schlachtung gelangt. 22 (73,3%) dieser Schweine schieden den Erreger kontinuierlich aus, acht (26,7%) intermittierend. Die Kontinuität der Ausscheidung wurde aufgrund der zu

späten Ferkel-2-Beprobung bei diesem Durchgang erst ab dem Läuferalter beurteilt. Alle Isolate wurden als *C. coli* identifiziert. Der Abfall der Nachweishäufigkeit zum Ferkel-2-Termin und der darauf folgende Anstieg waren hochsignifikant ($p < 0,0001$). Tabelle 24 zeigt die Prävalenzen.

Tab. 24: Ergebnisse der Untersuchungen von Kotproben auf *Campylobacter* spp. bei Schweinen des Betriebes B

	Durchgang 1 (Maststall B)			Durchgang 2 (Maststall B)			Durchgang 3 (Maststall C)		
	n	pos.	pos. (%)	n	pos.	pos. (%)	n	pos.	pos. (%)
MS	8	5	62,5	5	4	80,0	5	3	60,0
Ferkel 1	40	21	52,5	40	24	60,0	40	22	55,0
MS	8	7	87,5	5	4	80,0	n.u.	-	-
Ferkel 2	40	30	75,0	40	34	85,0	39	3	7,7
Läufer 1	n.u.	-	-	n.u.	-	-	39	30	76,9
Läufer	33	21	63,6	39	32	82,1	39	28	71,8
Mast	33	22	66,7	38	26	68,4	36	32	88,9
Schlachtung	24	16	66,7	62	57	91,9	73	66	90,4

n.u.= nicht untersucht

n= Probenanzahl

MS= Muttersau

Betrieb C:

Hier konnte ab dem Ferkelalter der Erreger regelmäßig nachgewiesen werden. Zum ersten Untersuchungstermin (Ferkel 1) waren 7 von 40 Ferkeln (17,5%) positiv. Zum zweiten Termin hin erfolgte ein hochsignifikanter Anstieg ($p < 0,0001$) auf 57,5%. Die 40 Ferkel stammten von neun Muttersauen. Bei sechs Sauen gelang der Erregernachweis zweimalig, zwei Sauen waren beide Male negativ (Sau A und B) und eine Sau wurde einmal positiv und einmal negativ getestet (Sau C). Zum Untersuchungstermin Ferkel 1 waren alle fünf untersuchten Ferkel von Sau A negativ, zwei der fünf untersuchten Ferkel von Sau B positiv. Vor dem Absetzen (Ferkel 2) schieden zwei Ferkel von Sau A und die beiden Ferkel von Sau B den Erreger aus. Drei der sechs *Campylobacter*-positiven Sauen hatten zum Termin Ferkel 1 erregerefreie Ferkel. Sau C hatte zuerst ein positives Ferkel, beim zweiten Termin kamen zwei weitere hinzu. Zu diesem Termin hatte jede Sau mindestens ein positives Ferkel. Im Läuferstall erreichte die Durchseuchung ihren Höchststand, 30 von 35 (85,7%) untersuchten Tieren schieden den Erreger aus. In der Mast gingen die Zahlen wieder etwas zurück. Insgesamt sind 32 Schweine, die permanent auf *Campylobacter* spp. untersucht wurden, zur Schlachtung gelangt. Es gab sowohl kontinuierliche (20 Tiere; 62,5%) als auch intermittierende Ausscheider (12 Tiere; 37,5%). Alle Isolate konnten als *C. coli* identifiziert werden. Neben dem signifikanten Anstieg der Isolierungsrate vom Ferkel-1- zum Ferkel-2-Termin ($p < 0,0001$) waren auch vom Ferkel-2- zum Läufer- ($p = 0,013$) sowie vom Mast- zum Schlachttermin ($p = 0,004$) solche Anstiege zu beobachten. Die genauen Untersuchungszahlen und Ergebnisse sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tab. 25: Ergebnisse der Untersuchungen von Kotproben auf *Campylobacter* spp. bei Schweinen des Betriebes C

Alter	n	positiv	positiv (%)
Muttersauen	9	6	66,7
Ferkel 1	40	7	17,5
Muttersauen	9	5	55,6
Ferkel 2	40	23	57,5
Läufer	35	30	85,7
Mast	37	27	73,0
Schlachtung	79	70	88,6

n= Probenanzahl

Betrieb D:

Auch in diesem Betrieb war der Erreger nachweisbar. Aufgrund der Haltungsbedingungen wurden die Muttersauen nicht beprobt. Schon zum ersten Untersuchungstermin war dieser Betrieb am stärksten belastet, am Ende der Säugeperiode schieden alle Ferkel den Erreger aus. Auch hier war der Anstieg vom Ferkel-1 zum Ferkel-2-Termin signifikant ($p = 0,002$). Auch im Läuferalter waren die Tiere stark belastet. Auffallend war hier eine signifikante Abnahme der Nachweisrate zum Beginn der Mast ($p < 0,0001$). Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse.

Tab. 26: Ergebnisse der Untersuchungen von Kotproben auf *Campylobacter* spp. bei Schweinen des Betriebes D

Alter	n	positiv	positiv (%)
Ferkel 1	40	30	75,0
Ferkel 2	38	38	100
Läufer	37	34	91,9
Mast 1	29	8	27,6
Mast 2	37	31	83,8
Schlachtung	60	38	63,3

n= Probenanzahl

4.2.1.2 Umgebungsproben

Art und Anzahl der untersuchten Umgebungsproben ist Tabelle 9 (Seite 41) zu entnehmen. *C. coli* war in vier der 458 untersuchten Umgebungsproben nachweisbar. Im Betrieb A konnte der Erreger von einer Fliege, im Betrieb B ebenfalls von einer Fliege sowie von einer Nippeltränke und im Betrieb D aus einem Wassertrog isoliert werden

4.2.2 Vorkommen zum Schlachtzeitpunkt

4.2.2.1 Kot, Tonsillen, Lymphknoten und Oberflächentupferproben

Betrieb A:

Im ersten Durchgang wurden 50 zur Schlachtung gelangte Schweine auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht. Auch wenn der Erreger zuvor im Stall nicht nachgewiesen werden konnte, gelang hier die Isolierung. Die vier Isolate stammten von vier verschiedenen Schweinen. Jeweils eine Kot- und eine Oberflächentupferprobe stammten von Schweinen, bei denen vorher keine Verlaufsuntersuchung auf *Campylobacter* spp. durchgeführt wurde. Alle Stämme konnten als *C. coli* identifiziert werden. Untersuchungszahlen und -ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tab. 27: Vorkommen von *Campylobacter* spp. zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb A, Durchgang 1

	n	positiv	positiv (%)
Kot	50	2	4
Darmbein-LK	50	0	-
Tierkörperoberfläche v. K.	50	2	4
Tierkörperoberfläche n. K.	50	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Auch im zweiten Durchgang wurde *C. coli* aus Kot- und Oberflächentupferproben nachgewiesen. Bei keinem Schwein wurde der Erreger gleichzeitig von Kot- und Oberflächentupfer isoliert. 28 der 45 geschlachteten Schweine sind permanent auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht worden. Bei zehn der zwölf Oberflächentupferproben und bei einer der drei Kotproben war eine Rückverfolgung möglich. Zwei Schweine, bei welchen der Erreger auf der Oberfläche zu finden war, waren zum Mast-2-Termin im Kot positiv. Von dem rückverfolgbaren Kot-positiven Tier wurde der Erreger erstmalig isoliert. Alle Isolate waren der Spezies *C. coli* zugehörig. Tabelle 28 zeigt Untersuchungszahlen und -ergebnisse.

Tab. 28: Vorkommen von *Campylobacter* spp. zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb A, Durchgang 2

	n	positiv	positiv (%)
Kot	45	3	6,7
Tonsillen	45	0	-
Darmbein-LK	45	0	-
Tierkörperoberfläche v. K.	45	12	26,7
Tierkörperoberfläche n. K.	45	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Betrieb B:

Im ersten Durchgang sind 75 Schweine zur Schlachtung gelangt. Kot und Lymphknoten wurden in diesem Durchgang nur bei den 24 Tieren auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht, die auch im Bestand überwacht wurden. Die Prävalenz im Kot auf dem Schlachthof (66,7%) war so hoch wie die im Bestand zur Mast (66,7%). Alle Isolate waren der Spezies *C. coli* zugehörig. Untersuchungszahlen und Ergebnisse sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tab. 29: Vorkommen von *Campylobacter* spp. zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb B, Durchgang 1

	n	positiv	positiv (%)
Kot	24	16	66,7
Darmbein-LK	24	0	-
Tierkörperoberfläche v. K.	75	13	17,3
Tierkörperoberfläche n. K.	75	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Zur Schlachtung des zweiten Durchgangs war eine sehr hohe Erregerprävalenz im Kot festzustellen. 26 der 28 (92,9%) Schweine, bei denen der Erreger aus den Tonsillen isoliert werden konnte, waren auch im Kot positiv. Bei allen fünf Schweinen, die den Keim im Lymphknoten beherbergten, konnte er auch im Kot nachgewiesen werden. Zugleich in Kot, Tonsillen und Lymphknoten war der Erreger bei zwei der 62 Schweine (3,2%) zu finden. Alle Isolate, die aus Kot, Tonsillen und Lymphknoten isoliert wurden, konnten als *C. coli* identifiziert werden. Auf der Oberfläche vor der Kühlung waren fünf Isolate (50%) der Spezies *C. coli* und fünf Isolate (50%) der Spezies *C. jejuni* zugehörig. Als *C. jejuni* konnten ebenfalls die drei nach der Kühlung isolierten Stämme identifiziert werden. Bei zwei dieser drei Schweine wurden *Campylobacter*-

Keime auch vor der Kühlung isoliert. Bei einem war *C. coli* und beim anderen *C. jejuni* nachweisbar. Die Untersuchungszahlen und Ergebnisse sind in Tabelle 30 dargestellt.

Tab. 30: Vorkommen von *Campylobacter* spp. zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb B, Durchgang 2

	n	positiv	positiv (%)
Kot	62	57	91,9
Tonsillen	62	28	45,2
Darmbein-LK	62	5	8,1
Tierkörperoberfläche v. K.	62	10	16,1
Tierkörperoberfläche n. K.	62	3	4,8

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Auch im dritten Durchgang konnte auf dem Schlachthof *C. coli* sehr oft aus dem Kot isoliert werden. 13 der 14 Schweine (92,9%), bei denen der Erreger in den Tonsillen nachweisbar war, beherbergten ihn auch im Darminhalt. Aus den Lymphknoten konnte *C. coli* bei zwei Schweinen isoliert werden. Zugleich war der Erreger bei beiden Schweinen noch im Kot und bei einem Schwein zusätzlich in den Tonsillen nachweisbar. Bei 20 Tieren (27,8%) war eine Isolierung von der Oberfläche möglich, der Kot von 17 (85,0%) dieser Tiere war zugleich erregertauglich. Bei drei Schweinen, bei denen *C. coli* nicht im Kot nachgewiesen wurde, war eine Isolierung von der Oberfläche möglich. Bei einem dieser Schweine war er zusätzlich in den Tonsillen nachweisbar. Tabelle 31 zeigt Untersuchungszahlen und Prävalenzen.

Tab. 31: Vorkommen von *Campylobacter* spp. zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb B, Durchgang 3

	n	positiv	positiv (%)
Kot	72	66	91,7
Tonsillen	72	14	19,4
Darmbein-LK	72	2	2,8
Tierkörperoberfläche v. K.	72	20	27,8
Tierkörperoberfläche n. K.	72	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Betrieb C:

Hier konnten insgesamt 79 Schweine zum Schlachtzeitpunkt untersucht werden. 70 Schweine wurden im Schlachtbetrieb A und neun Schweine in einer kleinen privaten Fleischerei geschlachtet. Wie zu erwarten, wurde der Erreger sehr häufig nachgewiesen. Alle Isolate konnten als *C. coli* identifiziert werden. Bemerkenswert ist, dass bei acht der neun Schweine (88,9%), die in der privaten Fleischerei geschlachtet wurden, *C. coli* von der Oberfläche isoliert werden konnte.

Bei fünf der sieben Schweine (71,4%), die den Erreger in den Tonsillen trugen, konnte er auch aus dem Kot isoliert werden. Von den 23 Schweinen, bei denen *C. coli* auf der Schlachtkörperoberfläche zu finden war, wurde er auch bei 18 Tieren (78,3%) im Kot nachgewiesen. Auch die drei Tiere, bei denen die Isolierung aus dem Lymphknoten gelang, waren zugleich im Kot positiv. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 dargestellt.

Tab. 32: Vorkommen von *Campylobacter* spp. zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb C

	Schlachtbetrieb A			Private Fleischerei		
	n	positiv	positiv (%)	n	positiv	positiv (%)
Kot	70	63	90,0	9	7	77,8
Tonsillen	n.u.	-	-	9	7	77,8
Darmbein-LK	34	3	8,8	9	0	-
Tierkörperoberfläche v. K.	70	15	21,4	9	8	88,9
Tierkörperoberfläche n. K.	70	0	-	n.u.	n.u.	-

n.u.= nicht untersucht n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

Betrieb D:

Wie in den Betrieben B und C konnte der Erreger häufig nachgewiesen werden. Alle Isolate waren der Spezies *C. coli* zugehörig. Bei 14 der 18 Schweine (77,8%), bei denen der Erreger in den Tonsillen nachweisbar war, gelang ebenso die Isolierung aus dem Kot. Bei drei der 60 geschlachteten Schweine (5,0%) war der Erreger zugleich in den Tonsillen, im Kot und auf der Oberfläche, bei weiteren drei Tieren im Kot und auf der Oberfläche und ebenfalls bei drei Tieren nur auf der Oberfläche nachweisbar. Tabelle 33 zeigt die Ergebnisse.

Tab. 33: Vorkommen von *Campylobacter* spp. zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb D

	n	positiv	positiv (%)
Kot	60	38	63,3
Tonsillen	60	18	30,0
Darmbein-LK	60	1	1,7
Tierkörperoberfläche v. K.	60	9	15,0
Tierkörperoberfläche n. K.	60	0	-

n= Probenanzahl LK= Lymphknoten
v.K.= vor Kühlung n.K.= nach Kühlung

4.2.2.2 Umgebungsproben

Die Umgebungsproben wurden ausschließlich im Zerlegebereich nach der Kühlung genommen. Nur aus einer Probe (0,6%) konnte *C. coli* isoliert werden. Tabelle 34 gibt einen Überblick über Art und Umfang der Proben.

Tab. 34: Ergebnisse der Umgebungsprobenuntersuchungen auf dem Schlachthof auf *Campylobacter* spp.

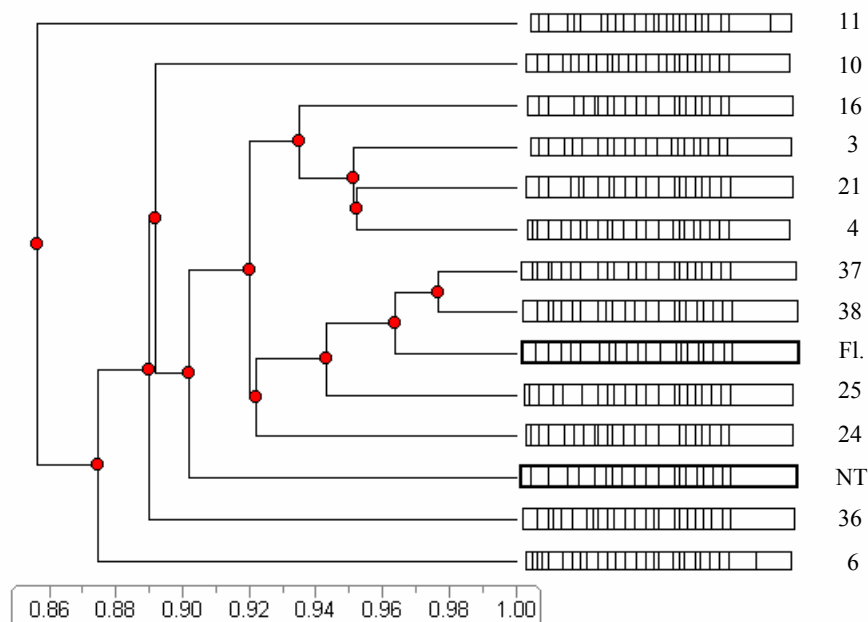
Probenmaterial	Probenanzahl	davon positiv
Zerlegetische	47	0
Messer	19	0
Fließbänder	24	0
Sägen	22	0
Kisten	23	0
Fußboden	10	0
Schuhsohle Zerlegepersonal	10	1
Teilstücke zerlegter Schweine	24	0
gesamt	179	1

4.2.3 Genotypisierung ausgewählter *Campylobacter*-Isolate

4.2.3.1 Umgebungsproben

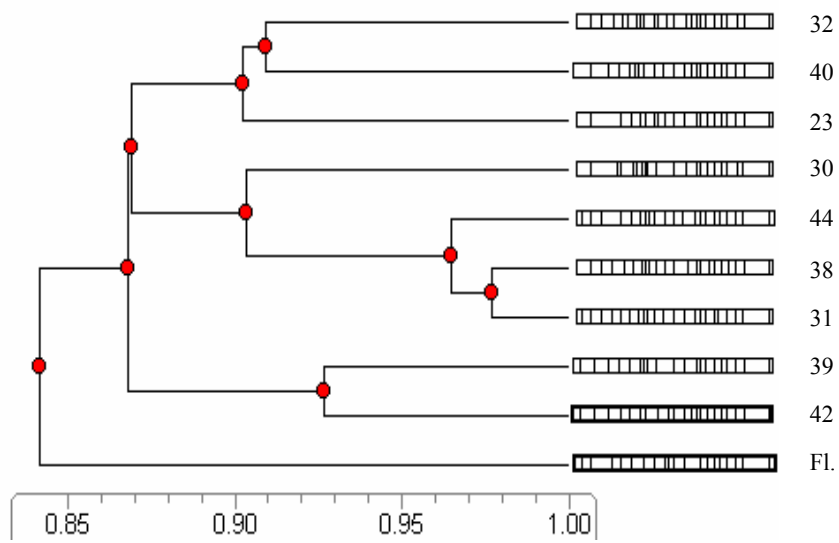
In den Betrieben A, B und D, wo eine Erregerisolierung aus Umgebungsproben gelang, wurden die Genotypen der Umgebungsisolate mit den Genotypen zeitgleich isolierter Schweinestämme verglichen. Als Methode kam die AFLP zur Anwendung. Insgesamt war eine große Vielfalt an Genotypen zu beobachten. Trotz der genetischen Vielfalt waren alle Stämme eng miteinander verwandt.

Im Betrieb B konnte zu einem Untersuchungstermin *C. coli* von einer Fliege und von einer Nippeltränke isoliert werden. Beide Isolate waren sehr eng mit den Schweinestämmen verwandt, wobei das Fliegenisolat mit den Kotisolaten zweier Schweine clusterte (96% Homologie der Stämme) (Abb 2). Der im Betrieb D aus einem Wassertrog isolierte Stamm war ebenfalls sehr eng mit den Stämmen aus den Kotproben verwandt. Er zeigte sogar 98% Homologie zu einem Kotisolat (Abb. 4). Etwas anders verhielt es sich mit dem Stamm, der von einer Fliege im Betrieb A isoliert wurde. Dieser zeigte nur eine geringere Homologie zu den Stämmen aus dem Kot und bildete mit keinem ein Cluster (Abb. 3).



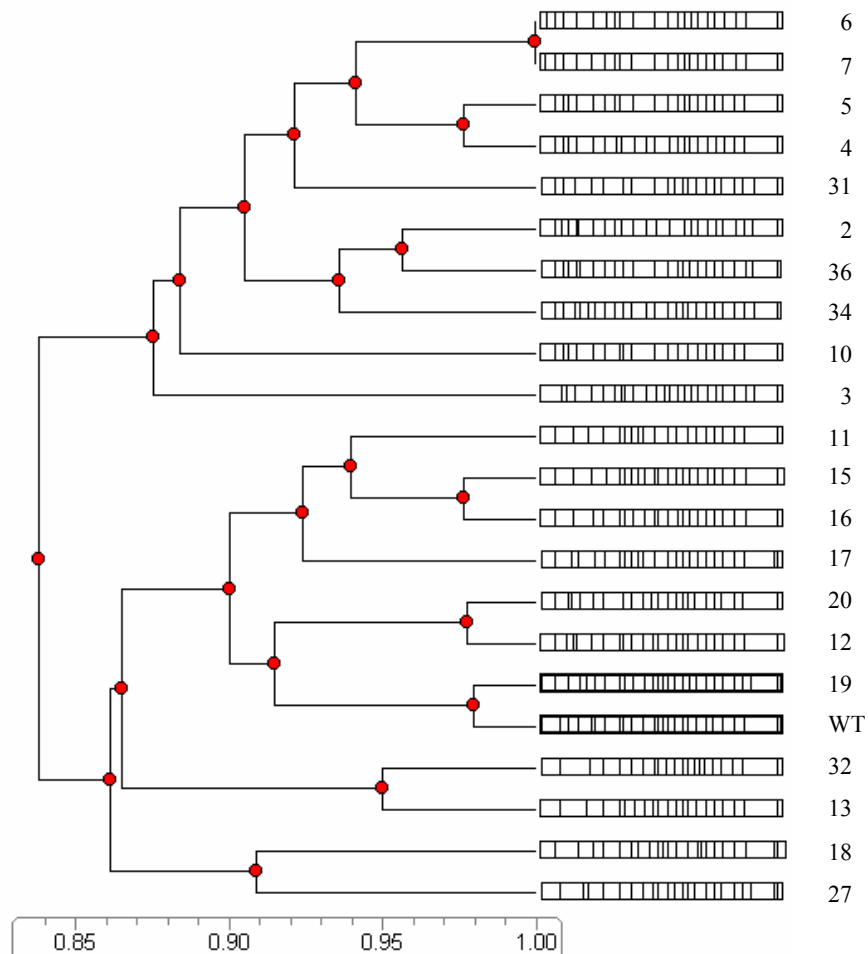
Fl.= Fliege NT= Nippeltränke Zahlen= Tiernummern

Abb. 2: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse zweier *C. coli*-Umweltstämme zu zeitgleich isolierten *C. coli*-Schweinestämmen, Betrieb B



Fl.= Fliege Zahlen= Tiernummern

Abb. 3: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse eines *C. coli*-Umweltstammes zu zeitgleich isolierten *C. coli*-Schweinstämmen, Betrieb A



WT= Wassertrog Zahlen= Tiernummern

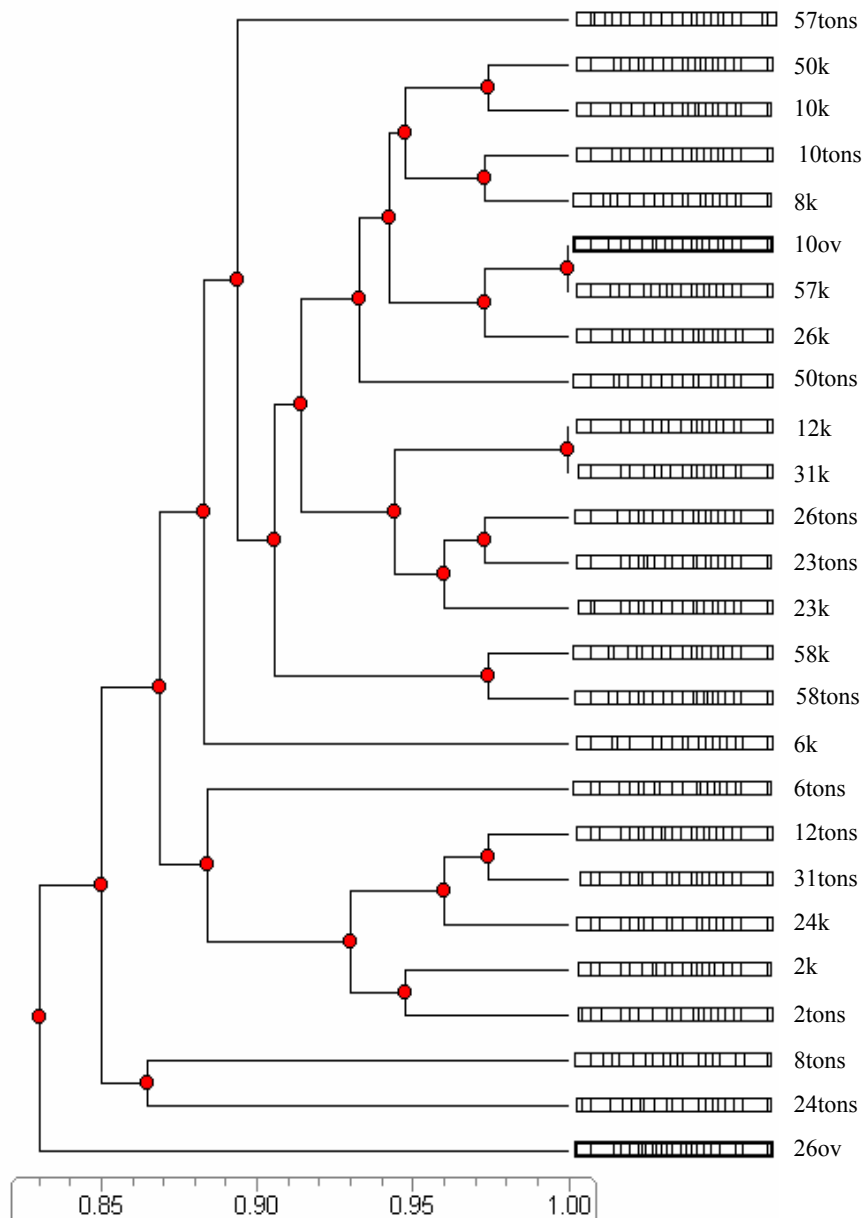
Abb. 4: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse eines *C. coli*-Umweltstammes zu zeitgleich isolierten *C. coli*-Schweinstämmen, Betrieb D

4.2.3.2 Proben auf dem Schlachthof

Bei der Schlachtung des zweiten Durchgangs des Betriebes B und bei der Schlachtung der neun Schweine des Betriebes C in der privaten Fleischerei wurden Genotypenvergleiche von Kot- und Organisolaten durchgeführt. Von Betrieb C wurden aufgrund der geringen Probenanzahl alle Isolate miteinander verglichen, von Betrieb B wurden 12 Schweine, bei denen der Erreger in Kot und Tonsillen und eventuell noch auf der Oberfläche nachweisbar war, zufällig ausgewählt.

Betrieb B:

Auch hier war eine große Genotypenvielfalt zu beobachten. Dennoch zeigten alle Stämme eine Homologie von 83% oder mehr. Bei manchen Schweinen (Nr. 58 und Nr. 2) waren die Stämme aus Kot und Tonsillen eng miteinander verwandt, bei anderen wiederum (z.B. Nr. 24 und Nr. 8) zeigten sie eine weniger enge Beziehung. Die Kotisolate zweier Schweine (Nr. 12 und Nr. 31) waren zu 100% identisch. Zwei weitere identische Isolate konnten aus dem Kot eines Schweines und von der Oberfläche eines anderen Schweines gewonnen werden (Nr. 57 und 10) (Abb. 5).

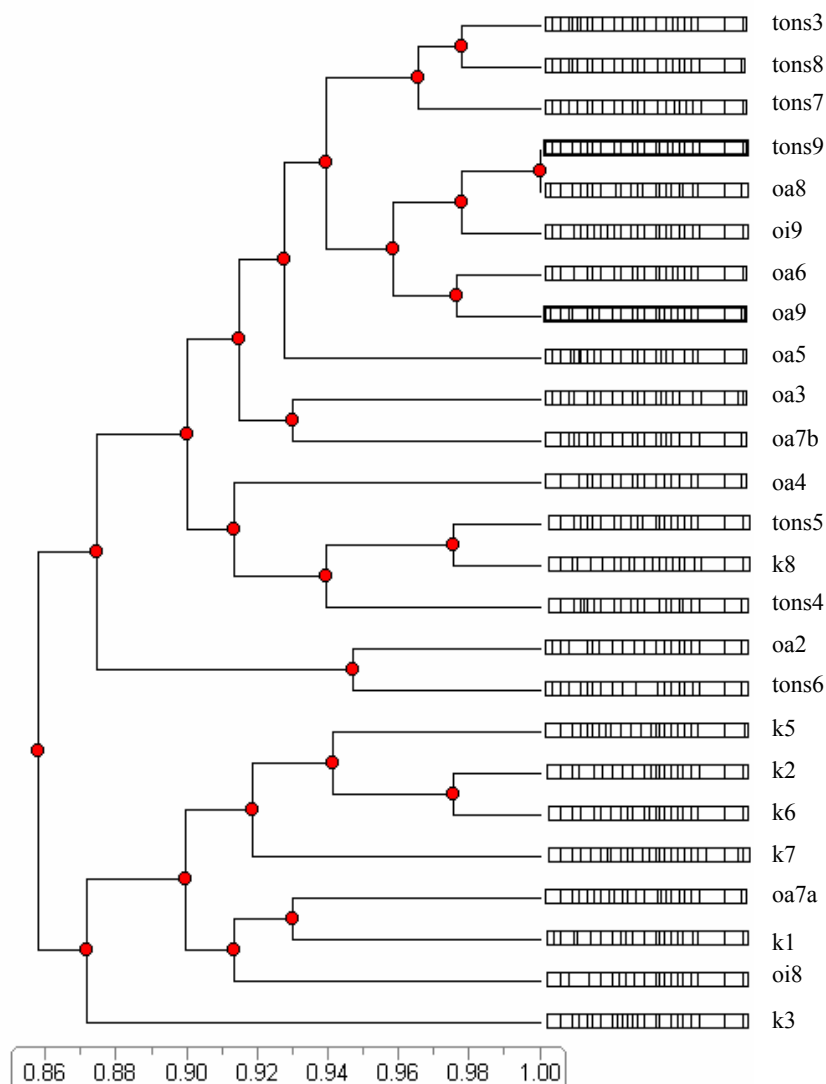


tons= Tonsille k= Kot ov= Oberfläche vor Kühlung Zahlen= Tiernummern

Abb. 5: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse von *C. coli*-Stämmen aus Kot, Tonsillen und von der Tierkörperoberfläche zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb B

Betrieb C:

Die Stämme zeigten eine große genetische Vielfalt. Für die dennoch enge Verwandtschaft spricht die Homologie von 86% oder mehr. Aus der Tonsille (Schwein 9) und von der Oberfläche (Schwein 8) von zwei nebeneinanderhängenden Tieren konnten zu 100% identische Isolate gewonnen werden. Von der Oberfläche von Schwein 7 wurden zwei phänotypisch verschiedene Kolonien isoliert. Diese beiden Stämme differierten auch deutlich in ihrem Genotyp (Nr. 7a und Nr. 7b). Bei drei Schweinen (Nr. 6, 8 und 9) waren Stämme mit einer Homologie von >95% von der Oberfläche isolierbar (Abb. 6).



tons= Tonsille k= Kot oa= äußere Oberfläche vor Kühlung oi= innere Oberfläche vor Kühlung
Zahlen= Tiernummern

Abb. 6: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse von *C. coli*-Stämmen aus Kot, Tonsillen und von der Tierkörperoberfläche zum Schlachtzeitpunkt, Betrieb C

5 Diskussion

Die Infektionen mit *Campylobacter* spp. und *Y. enterocolitica* stellen weltweit häufige Ursachen der bakteriellen Enteritis infectiosa des Menschen dar. Die Übertragung dieser Erreger erfolgt vor allem über Lebensmittel, aber auch durch den Kontakt zu infizierten Menschen oder Tieren kann es zur Infektion kommen. Ebenso scheint eine Ansteckung über Wasser möglich zu sein. Nach dem heutigen Erkenntnisstand ist auch Schweinefleisch eine Infektionsquelle dieser beiden Erreger für den Menschen. Die Kenntnisse über die tatsächliche Bedeutung dieses Lebensmittels als Ursache humaner Infektionen sowie über die Eintragswege dieser Bakterien in die Schweinebestände und über die Erfordernisse und Möglichkeiten des Eingreifens sind jedoch noch lückenhaft.

In dieser Arbeit wurden Schweine in vier verschiedenen Betrieben, darunter einer mit ökologischer Haltung, auf das Vorkommen von *Y. enterocolitica* und thermophilen *Campylobacter* spp. untersucht. Die Tiere wurden von ihrer Geburt an bis zu ihrer Schlachtung verfolgt. Solche Untersuchungen liegen für *Y. enterocolitica* bislang noch nicht vor. Über diese Verlaufsuntersuchungen sollten Prävalenzen, Kolonisationszeitpunkte und Infektionsquellen ermittelt werden. Mit Hilfe einer molekularbiologischen Fingerprintingmethode wurden in der Umgebung gefundene *C. coli*-Isolate mit den zeitgleich im Bestand isolierten Stämmen verglichen.

5.1 Vorkommen von *Y. enterocolitica* 4/O:3 bei Schweinen

5.1.1 Kotproben in den Betrieben und auf dem Schlachthof

Y. enterocolitica 4/O:3 konnte in zwei (Betrieb B, Durchgang 1 und 2, sowie Betrieb C) der vier untersuchten Betriebe in Schweinekotproben nachgewiesen werden. Der Nachweis des Erregers war aber nur in der Mast möglich. Von Sauen, Ferkeln und Läufern gelang keine Isolierung. In diesen beiden Betrieben war auffallend, dass etwa fünf Wochen nach dem Einstellen in den Mastbereich zuerst nur sehr wenige Tiere den Erreger ausschieden. Im weiteren Verlauf der Mast ist die Anzahl *Yersinia*-positiver Schweine enorm angestiegen (Betrieb B, 1. Durchgang und Betrieb C). In den beiden Betrieben waren zum ersten Mastuntersuchungstermin insgesamt 15 Tiere positiv. Zum zweiten Mastuntersuchungstermin, der etwa acht Wochen später stattfand, schieden von diesen 15 Schweinen nur noch zwei (13,3%) den Erreger aus. Alle anderen positiven Schweine waren erstmalig kolonisiert. Dass der Erreger nach der Infektion nur über einen gewissen Zeitraum ausgeschieden wird, wurde bereits in der Literatur beschrieben (FUKUSHIMA et al. 1983, NIELSEN et al. 1996). Da des Weiteren eine Reinfektion der Schweine nicht möglich ist, scheint hierfür die Ursache eine im Darm gebildete Immunität zu sein (FUKUSHIMA 1983). Auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde die temporäre Ausscheidung beobachtet. Zum einen war dies beim Vergleich des Mast-1- mit dem Mast-2-Termin ersichtlich, zum anderen konnte der Erreger nur bei zwei von insgesamt 439 (0,5%) untersuchten Tieren im Kot auf dem Schlachthof gefunden werden, obwohl insgesamt 96 Tiere zum Mast-2-Termin positiv waren. Die Untersuchungsabstände zwischen den beiden Mastterminen

bzw. zwischen dem zweiten Masttermin und der Schlachtung betrugen etwa 6-7 Wochen. Aufgrund dieser langen Intervalle ist ein genaues Bestimmen des Kolonisationszeitpunktes nicht möglich gewesen. Geht man davon aus, dass sich ein Tier bereits ca. 3-4 Wochen vor der Untersuchung infiziert hat und dass die Ausscheidung bis kurz vor den nächsten Untersuchungstermin andauert, würde die Ausscheidungsdauer maximal 9-11 Wochen betragen. Eine ähnlich lange Ausscheidungsdauer beobachteten auch NIELSEN et al. (1996) bei künstlich infizierten Schweinen. Bei diesem Versuch schieden nach 49 Tagen post infectionem weniger als 10% der Tiere den Erreger aus, nach 68 Tagen gelang bei keinem Schwein der Nachweis. Auch FUKUSHIMA et al. (1983) beobachteten eine etwa elfwöchige Ausscheidungsdauer bei künstlich infizierten Schweinen, die zwischen 8 und 15 Wochen alt waren.

Ein nicht zu erwartendes Ergebnis zeigte sich im zweiten Durchgang des Betriebes B. Hier war zum Mast-2-Termin die Prävalenz um 42% niedriger als zum Mast-1-Termin. Eine mögliche Ursache für diesen Rückgang kann die Verabreichung antimikrobiell wirksamer Substanzen gewesen sein. Aufgrund einer Erkrankungsproblematik im Bestand wurden zwischen den beiden Untersuchungsterminen alle Tiere des Bestandes über acht Tage oral mit Anisulf ASS (Sulfadimidin/ Sulfamerazin/ Acetylsalicylsäure) behandelt. Die isolierten Stämme wurden allerdings nicht auf ihre Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen geprüft.

Die Tatsache, dass *Y. enterocolitica* nicht zum Ende der Läuferperiode, sondern erst nach dem Umstallen in den Maststall isoliert werden konnte, deutet darauf hin, dass die Infektionsquelle im Maststall zu suchen ist. Dafür spricht auch, dass im dritten Durchgang des Betriebes B, der in einem anderen Maststall als die ersten beiden Durchgänge gemästet wurde, keine Isolierung aus dem Kot möglich war. Somit ist auch gezeigt, dass innerhalb eines Betriebes verschiedene Ställe als eigene epidemiologische Einheiten zu betrachten sind.

Zu Prävalenzen des Erregers im Kot im Bestand liegen kaum Untersuchungen vor. PILON et al. (2000) untersuchten Kotproben von 20 verschiedenen Mastbetrieben. Die Prävalenzen lagen zwischen 0% und 46,9%. BUSH et al. (2003) wiesen im Mastbereich in 12,8% der Kotproben *Y. enterocolitica* nach. LEDERGERBER et al. (2003) fanden in 75 von 133 Proben (56,4%), die etwa 14 Tage vor der Schlachtung genommen wurden, potentiell humanpathogene *Y. enterocolitica*. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden Prävalenzen zwischen 0% (Betriebe A und D, sowie Betrieb B, 3. Durchgang [Maststall C]) und 65,4% (Betrieb B, 1. Durchgang [Maststall B]) gefunden. Im allgemeinen sind in der Literatur Nachweisraten im Kot mit $\leq 10\%$ angegeben. Diese niedrige Nachweisrate ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass zumeist nur Kotproben von Schweinen zum Zeitpunkt der Schlachtung untersucht wurden. Zu diesem Zeitpunkt liegt die Infektion wahrscheinlich lange genug zurück, so dass eine Eliminierung aus dem Darmtrakt möglich ist. Das erklärt auch die hier gefundene geringe Nachweisrate in Kotproben auf dem Schlachthof von 0% - 1,7%.

5.1.2 Tonsillen, Lymphknoten, Schlachtkörperoberfläche

Die Prävalenz des Erregers auf dem Schlachthof in den Tonsillen kann enorm differieren. Grundsätzlich kann nach diesen Untersuchungen gesagt werden, dass der Nachweis im Betrieb mit dem auf dem Schlachthof in Beziehung steht. Ist im Betrieb eine häufige Isolierung etwa zu Beginn des dritten Mastdrittels aus dem Kot möglich, ist auch mit einer starken Belastung in den Tonsillen zum Schlachtzeitpunkt zu rechnen. In den Betrieben B (Durchgang 1 und 2) und C konnte zum Zeitpunkt Mast 2 zu jeweils 65,4%, 4,9% und 48,2% der Erreger aus dem Kot isoliert werden. Die Nachweisraten in den Tonsillen auf dem Schlachthof lagen bei jeweils 68,8%, 62,9% und 56,7%. Die niedrige Nachweisrate von 4,94% im zweiten Durchgang des Betriebes B ist wahrscheinlich auf die Antibiotikagabe (siehe 5.1.1) zurückzuführen. Auf dem Schlachthof lag die Nachweisrate mit 62,9% dann wieder annähernd so hoch wie im ersten Durchgang. Die Antibiotika konnten den Erreger offensichtlich aus dem Darm eliminieren, eine Persistenz in den Tonsillen aber nicht unterbinden. Die Nachweisraten in den Tonsillen sind bei Betrieb B Durchgang 1 und 2 und bei Betrieb C ähnlich hoch wie von NESBAKKEN (1988), FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2000 und 2001a) und KORTE et al. (2004) beschrieben.

Bemerkenswert ist, dass auf dem Schlachthof ein Nachweis in den Tonsillen auch bei Schweinen der Betriebe möglich war, bei welchen im Bestand keine Isolierung gelang (Betriebe A und D sowie 3. Durchgang Betrieb B). Die Nachweisrate war in diesen Beständen mit 8,0% und 15,6% (Betrieb A 1. und 2. Durchgang), 5% (Betrieb D) und 5,6% (Betrieb B, 3. Durchgang) aber deutlich geringer als in den oben genannten. Es ist unklar, welche Faktoren dazu führen, dass sich der Erreger in einigen Beständen so stark ausbreitet, in anderen wiederum nicht, obwohl ihn einzelne Schweine tragen und somit eine potentielle Infektionsquelle darstellen. Andererseits wäre aber auch eine Kontamination der Tonsillen auf dem Schlachthof denkbar. Durch Koprophagie der Faeces von Schweinen infizierter Bestände kann der Erreger in den Rachenbereich gelangt sein. Allerdings erscheint diese Möglichkeit weniger wahrscheinlich, da die Erregerausscheidung mit dem Kot zum Schlachtzeitpunkt relativ gering ist und die Treibgänge und Warteböden mit heißem Wasser zwischengereinigt wurden.

Bei einzelnen Schweinen konnte der Erreger auch aus den Darmbeinlymphknoten isoliert werden (4 von 370 untersuchten Lymphknoten; 1,1%). Bei diesen vier Tieren gelang ebenso die Isolierung aus den Tonsillen.

Von den insgesamt 886 untersuchten Oberflächentupferproben, die vor und nach der Kühlung genommen wurden, konnte nur in einer einzigen Probe (0,1%) *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. ANDERSEN (1988) beschrieb den Einfluss verschiedener Ausweidetechniken in Bezug zur Karkassenkontamination. Beim manuellen Umschneiden des Darmes konnte er am medialen Hinterbein häufiger (26,3%) *Y. enterocolitica* O:3 isolieren als bei der Nutzung eines Bung cutters (13,4%). Die Kontamination war am geringsten (3,0%), wenn neben der Nutzung des Bung cutters das Rektum mit einer Plastiktüte verschlossen wurde. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen NESBAKKEN et al. (1994). Bei 60 in Norwegen geschlachteten Schweinen, bei welchen der Anus nicht verschlossen wurde, konnten sie bei sieben Tieren (11,7%) den Erreger von der Oberfläche isolieren. Bei 60 anderen Schlachtschweinen, bei welchen ein Verschluss mittels

Plastiktüte durchgeführt wurde, war der Erreger auf der Oberfläche nicht nachweisbar. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen, wo ein Bung cutter genutzt, das Rektum aber nicht mit einer Plastiktüte verschlossen wurde, war die Prävalenz auf dem Schlachttierkörper mit 0,1% sehr gering. Ursache hierfür ist wahrscheinlich das Schlachten nach dem Ende der Ausscheidungsphase. Der Erreger konnte kaum im Kot nachgewiesen werden (siehe 5.1.1.), somit ist auch eine Kontamination der Karkasse durch denselben unwahrscheinlich. Ein ähnliches Ergebnis ist auch bei BONARDI et al. (2003) zu finden. Bei 150 untersuchten Oberflächentupferproben gelang kein Erregernachweis, obwohl das Rektum nicht mit einer Plastiktüte verschlossen wurde. Auch hier war der Nachweis im Kot mit 4,0% (6 von 150) sehr gering.

BÜLTE et al. (1991) halten den Kontaminationsweg durch die Eviszeration für weniger bedeutsam, da die Trennung von Tierkörper- und Organband die Verbreitung des Erregers auf die Muskulatur offensichtlich reduziert. Als Quelle für die Kontamination des Schlachttierkörpers werden auch die Tonsillen vermutet. Trotz der häufig sehr starken Belastung dieser war *Y. enterocolitica* extrem selten auf der Oberfläche nachweisbar. Die Tonsillen scheinen somit den Schlachttierkörper kaum zu kontaminieren. Viel größere Bedeutung kommt ihnen bei der Kontamination des Geschlinges zu (FREDRIKKSON-AHOMAA et al. 2001a). So fand die Autorin, dass das Geschlinge stärker belastet ist als die Nieren. In Finnland war der Erreger aber auch häufig von den Nieren isolierbar, weil die Nieren nicht wie in Deutschland im Schlachttierkörper verbleiben, sondern mit dem Geschlinge an einen Haken gehängt werden.

5.1.3 Saisonalität

In der Literatur ist beschrieben, dass in kühleren und kalten Monaten die Inzidenz der humanen Yersiniose höher ist als in den wärmeren Monaten (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). In den hier untersuchten Schweinebeständen konnte keine deutliche Saisonalität bezüglich der Prävalenzen beim Schwein beobachtet werden. So wurden in den kalten Monaten Dezember und Januar auf der Stufe Schlachthof hohe und niedrige Prävalenzen in den Tonsillen nachgewiesen (Betrieb B, 1. Durchgang; Betrieb A, 2. Durchgang). Eine höhere Prävalenz im Winter als im Sommer war aber im Betrieb A zu beobachten. Hier waren im Januar fast doppelt so viele Tiere wie im August positiv. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen sind die Schweine aber überwiegend in kühleren bis kalten Monaten geschlachtet worden, Schlachtungsdaten aus den Sommermonaten fehlen nahezu. Um bessere Aussagen bezüglich der Saisonalität beim Schwein treffen zu können, wären weitere Untersuchungen zu definierten Zeitpunkten (z.B. Schlachtung), die gleichmäßig über das Jahr verteilt sind, von stets den gleichen Betrieben anzuraten. Zur besseren Übersicht sind die Schlachtmonate und Prävalenzen in Tabelle 35 dargestellt.

Tab. 35: Prävalenzen von *Y. enterocolitica* in Tonsillen in Bezug zum Schlachtzeitpunkt

Betrieb	Durchgang	Monat/Jahr der Schlachtung	Prävalenz in Tonsillen (%)
A	1	August 2003	8,0
A	2	Januar 2004	15,6
B	1	Dezember 2002	68,8
B	2	Oktober 2003	62,9
B	3	März 2004	5,6
C	1	März 2003	56,7
D	1	Oktober 2004	5,0

5.1.4 Infektionsquellen

Die Frage nach der Infektionsquelle konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es wurde beschrieben, dass der Erreger vor allem in solchen Mastbetrieben zu finden ist, die Schweine verschiedener Herkunft beziehen (SKJERVE et al. 1998, NESBAKKEN et al. 2002). Ein Einschleppen durch Schweine anderer Bestände in den Maststall kann in diesen Betrieben ausgeschlossen werden, da sie ihre Tiere ausschließlich nur von einem Ferkelerzeuger (außer Betrieb D) beziehen. Auch aus keiner der 458 in den Ställen genommenen Umgebungsproben konnte *Y. enterocolitica* isoliert werden. Ebenso gelang nach Reinigung und Desinfektion der Ställe kein Nachweis. Ein Grund hierfür kann die Nachweismethode sein. Die kulturelle Methode scheint bei Umgebungsproben der PCR unterlegen zu sein (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003).

In einer kanadischen Studie wurden 1944 Umgebungsproben untersucht (PILON et al. 2000). Aus 17 (0,6%) konnte der Erreger isoliert werden. Hierunter fielen drei Rohrleitungen, drei Trennwände, zwei Schaufeln, zwei Nippeltränken, eine Futterprobe aus dem Fresstrog, ein Stiefel, eine Leitungswasserprobe, zwei Proben vom Gang, eine Treppenstufe und eine Probe im Eingangsbereich. Wie in dieser Untersuchung konnte *Y. enterocolitica* nicht an Lüftungen, in Nagern, auf Fliegen oder in Futterproben, die noch nicht mit Schweinen in Kontakt gekommen sind, nachgewiesen werden. Die Autoren folgerten aufgrund dieser Ergebnisse und aufgrund dessen, dass pro Farm nur ein Genotyp isoliert werden konnte, der über den gesamten Untersuchungszeitraum (6 Monate) persistierte, dass externe Quellen für den Erregereintrag nur von minimaler Bedeutung sein können.

KORTE et al. (2004) untersuchten die Tonsillen von 215 Sauen, die auf verschiedenen Schlachthöfen in Finnland geschlachtet wurden. In 30 Proben (14%) konnten sie *yadA*-positive *Y. enterocolitica* nachweisen. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die Sauen eine bedeutende Kontaminationsquelle für die Schweinebestände sein könnten. Aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen scheint diese Vermutung aber eher unwahrscheinlich zu sein. Keine der 72 in den Betrieben B und C untersuchten Muttersauen schied den Erreger mit dem Kot aus. Aus keinem der Ferkel oder Läufer, die mehr oder minder engen Kontakt zu

den Sauen hatten, konnte der Erreger isoliert werden. Erst in den Mastbeständen, die von den Sauenbeständen räumlich weit getrennt sind, gelang der Nachweis. Diese Tatsache spricht gegen eine grundlegende Beteiligung der Sauen am Infektionsgeschehen. Über Prävalenzen des Erregers bei Sauen stehen momentan keine weiteren Daten zur Verfügung. Als Ursache für die niedrige Prävalenz in den Tonsillen wird eine Altersresistenz vermutet (KORTE et al. 2004). Um die Verbreitung des Erregers unter Sauen festzustellen, sind weitere Datenerhebungen unumgänglich. Sinnvoll wären *in-vivo*-Untersuchungen von Pharynx tupfern bei Sauen und die Untersuchung des Kotes ihrer Ferkel. Die Untersuchung von Pharynx tupfern scheint bei älteren Schweinen sinnvoll zu sein, da im Kot der Erreger nur für eine gewisse Zeit nach einer Neuinfektion nachweisbar ist. Es ist davon auszugehen, dass bei diesen Schweinen die Infektion bereits einige Zeit zurückliegt. Da die Tonsillen der Ort der Erregerpersistenz sind, wären Tupferproben vom hinteren Pharynxbereich bestens für die Sauenuntersuchung geeignet. Allerdings ist die Probennahme deutlich aufwändiger und schwieriger als bei Kotproben.

Eine Schweizer Studie konnte für das Auftreten von *Y. enterocolitica* einen signifikanten Risikofaktor identifizieren. Betriebe, die zum Einstellen Medizinalfutter zusetzten, hatten ein höheres Risiko, *Yersinia*-positiv zu sein als solche, die keine Einstallungsprophylaxe verabreichten (LEDERGERBER et al. 2003). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen führten alle drei Betriebe mit konventioneller Schweinehaltung (Betriebe A, B, C) eine Einstallungsprophylaxe nach Umsetzen in den Läuferstall und die Betriebe A und B auch nach Einstellung in den Mastbereich durch. Trotz dieser Prophylaxe breitete sich der Erreger in Betrieb A und Betrieb B, 3. Durchgang (Maststall C) nicht aus. Allerdings wurden hier nur vier Betriebe untersucht, in der oben genannten Schweizer Studie waren es 88 Betriebe.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Gebäudealter (bzw. seiner Nutzungsdauer zur Schweinehaltung) und damit steigendem Infektionsdruck konnte nicht gefunden werden. Zwar sind die negativen Betriebe A und D relativ neu (1993 und 2002), aber der *Yersinia*-negative Maststall C des Betriebes B wurde seit Anfang der siebziger Jahre für die Schweinehaltung genutzt und ist somit der älteste hier untersuchte Betrieb. Die *Yersinia*-positiven Betriebe C und B, Maststall B halten seit 1973 bzw. seit Anfang der achtziger Jahre Schweine. Aber ein Zusammenhang zwischen dem Gebäudealter und dem Infektionsrisiko ist durchaus denkbar, da sich im Laufe der Jahre die Wahrscheinlichkeit der Erregereinschleppung erhöht. Ist der Erreger einmal im Bestand, so scheint er dann zu persistieren (SKJERVE et al. 1998).

In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte auch kein Zusammenhang zwischen der Erregerprävalenz und der Art des Tränkwassers (Brunnen/Leitungswasser) oder der Art des Futters (hofeigen/Zukauf) festgestellt werden.

5.1.5 Serotypen

Alle in dieser Arbeit isolierten *Y. enterocolitica*-Stämme gehörten bis auf einen einzigen O:9-Stamm dem Serovar O:3 an. Dieses Serovar, in Kombination mit dem Biotyp 4, wird am häufigsten bei humanen *Y.*

enterocolitica-Infektionen nachgewiesen. Die hohe Isolierungsrate dieses Serotypes aus Tonsillen oder Maulhöhle stimmt mit den Funden vieler anderer Autoren überein (NESBAKKEN 1988, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2000 und 2001a, NESBAKKEN et al. 2002, KORTE et al. 2004). Auch im Kot der Schweine wurde dieses Serovar nachgewiesen (ASPLUND et al. 1990, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001a). Das Serovar O:9 wurde beim Schwein ebenso schon mehrfach isoliert. Dass es hier nur einmal nachgewiesen werden konnte, kann an der Anreicherungs-methode liegen. Die hier verwandte ITC-Bouillon ist stark selektiv für pathogene Yersinien, besonders für das Serovar O:3 (WAUTERS et al 1988). Für die Isolierung anderer Serotypen oder *Yersinia* spp. kann beispielsweise TSB oder die Kälteanreicherung genutzt werden. Nachteil der Kälteanreicherung ist aber neben der langen Anreicherungsdauer von 21 Tagen auch die Gefahr der Überwucherung mit anderen psychrotrophen Bakterien. Da in dieser Arbeit das Vorkommen pathogener Yersinien untersucht werden sollte, war ITC das Anreicherungsmedium der Wahl.

5.1.6 Genotypisierung

Die Untersuchungen wurden nur in einem Bestand durchgeführt. Es wurden Stämme, die zum Zeitpunkt Mast 2 isoliert wurden, mit Stämmen aus den Tonsillen (Schlachtung) verglichen. Dabei wurden Tiere ausgewählt, die zu beiden Terminen positiv waren.

Auffallend war die starke Ähnlichkeit zwischen den Stämmen. Auch PILON et al. (2000) stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass innerhalb eines Betriebes immer nur ein Genotyp isoliert werden konnte, dass aber die Genotypen auf verschiedenen Farmen unterschiedlich waren.

Dass das Genom von *Y. enterocolitica* sehr stabil ist, wurde bereits mehrfach beschrieben (NAJDENSKI et al. 1994 und 1995). Auch konnten keine Differenzen im Genotyp bei plasmidtragenden und bei plasmidlosen Stämmen beobachtet werden. Dass nur ein Genotyp pro Farm vorkommt, spricht dafür, dass es offensichtlich nur eine Infektionsquelle gibt. Diese Quelle scheint der Maststall zu sein, in den der Erreger irgendwann einmal eingetragen wurde und wo er nun persistiert. Gegen eine Persistenz des Erregers spricht aber, dass er in Umgebungsproben und in Proben nach Reinigung und Desinfektion, die vor der Neubelegung eines Stalles genommen wurden, nicht nachzuweisen war. Dies könnte aber auch an methodischen Problemen gelegen haben. Die Isolierung des Erregers aus Umweltproben ist häufig schwierig, da in solchen Proben oft nur wenige pathogene Stämme vorhanden und sie reich an Begleitflora sind (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA 2003).

5.1.7 Pathogenitätsprüfung

Um eine volle Pathogenität auszubilden, bedarf es bei *Y. enterocolitica* sowohl chromosomal- als auch plasmid-kodierter Virulenzfaktoren (BOTTONNE 1997). Ein chromosomal-kodiertes Virulenzgen ist das *ail*-Gen, welches in dieser Arbeit bei allen Isolaten nachgewiesen wurde. Um das Vorhandensein eines Virulenzplasmids zu bestätigen, wurde eine PCR durchgeführt, die das auf dem Plasmid liegende *yopT*-Gen

amplifiziert. Bei 110 der 111 (99,1%) zum Zeitpunkt der Mast isolierten Stämme konnte das Plasmid nachgewiesen werden. Anders zum Schlachtzeitpunkt: Hier wurden insgesamt 152 Stämme aus Tonsillen, Lymphknoten, Kot und von der Schlachttierkörperoberfläche isoliert, aber nur 126 (82,9%) besaßen ein Plasmid. Auch BUCHER (2001) befand bei der Untersuchung von 78 zum Schlachtzeitpunkt isolierten *Y. enterocolitica*-4/O:3-Stämmen nur 70 (89,7%) als pathogen. Hier erfolgte der Pathogenitätsnachweis mit Hilfe des CRMOX-Agar, mit dem der Nachweis plasmidkodierter Eigenschaften möglich ist. Ebenso stuften FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001a) nur 92% (70 von 76) aus Tonsillen isolierte Stämme des Bioserovars 4/O:3 als pathogen ein. Der Pathogenitätsnachweis wurde auch hier mit dem CRMOX-Agar durchgeführt.

Es ist bekannt, dass das Plasmid instabil ist und bei Subkultivierungen im Labor verloren gehen kann (IBRAHIM et al. 1992, BHADURI und COTTRELL 1997, LI et al. 1998). Die hier durchgeführten Untersuchungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass mit zunehmender Infektionsdauer auch im Tier das Plasmid verloren geht, da zu Beginn der Infektion, im Maststall, fast 100% ein Plasmid trugen, auf dem Schlachthof hingegen fehlte es bei 17,1% der isolierten Stämme. Möglicherweise „altern“ Yersinien und verlieren dabei ihr Plasmid. Die Stämme, denen das Plasmid fehlt, besitzen nicht mehr die Fähigkeit zur Kolonisierung und können wahrscheinlich früher oder später vom Schwein eliminiert werden. Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass nur bei relativ wenigen Sauen der Erreger in den Tonsillen nachweisbar ist. Unterstützt wird diese Aussage durch eine italienische Studie. In dieser wurde bei Schlachtschweinen nur in 14,7% der Tonsillen der Erreger nachgewiesen (BONARDI et al. 2003). Diese Schweine aber hatten ein Schlachtgewicht zwischen 150 und 180 kg. Die in dieser Arbeit untersuchten Schweine wurden mit einem Gewicht von etwa 100-120 kg, wie es in Deutschland üblich ist, geschlachtet. Geht man von einer Tageszunahme von zirka 1 kg aus, müssen die italienischen Schweine etwa vier bis acht Wochen älter gewesen sein. Möglicherweise kommt es schon binnen dieses Zeitraums zum Plasmidverlust und zur Erregereliminierung. Leider wurde bei dieser Studie kein Plasmidnachweis durchgeführt. Eine andere Erklärung für die niedrige Prävalenz kann aber auch sein, dass die Schweine schon zu Lebzeiten kaum mit dem Erreger belastet waren.

Um die These des Plasmidverlustes und einer folgenden Eliminierung verifizieren zu können, bedarf es Untersuchungen an möglichst natürlich infizierten Schweinen, bei denen eine Verfolgung länger als nur bis zum Erreichen des Schlachtgewichts möglich ist.

Eine andere Erklärung für den Plasmidverlust könnte auch die Temperaturerhöhung während des Brühens des Schweines auf dem Schlachthof oder während des Abflammens der Probe im Labor sein. Die Kotproben, bei denen das Plasmid zu fast 100% nachweisbar war, waren zu keinem Zeitpunkt diesem Temperaturstress ausgesetzt. Es wäre denkbar, dass unter diesem Einfluss das Plasmid verloren gegangen ist. Leider sind in der Literatur keine Daten darüber zu finden, wie schnell das *Yersinia*-Virulenzplasmid bei kurzem, starkem Temperaturstress verloren gehen kann. Aber es ist bekannt, dass bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C schneller ein Plasmidverlust zu beobachten ist als bei 28-30°C.

5.1.8 Schweinefleisch als Infektionsquelle für den Menschen

Da Schweine häufig Träger humanpathogener Yersinien sind und eine Kontamination ihres Fleisches während des Schlachtprozesses möglich ist, scheint eine Infektion des Menschen über rohes Schweinefleisch und -produkte durchaus wahrscheinlich. In Abb. 7 sind die Fleischverzehrsgewohnheiten in der Europäischen Union (EU) dargestellt (ANON. 2004b).

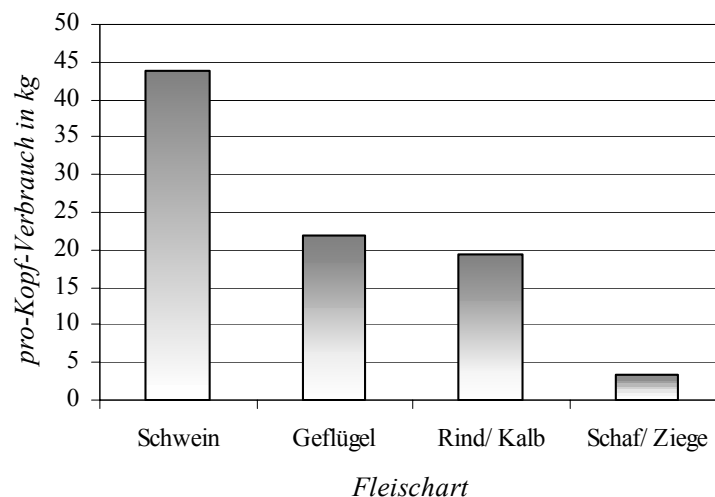


Abb. 7: Überblick über Art und Menge des verzehrten Fleisches in der EU im Jahr 2003 (ANON. 2004b)

Allerdings sind humanpathogene Yersinien nur relativ selten im Fleisch nachweisbar. Es ist zu vermuten, dass auch andere Infektionsquellen, wie Wasser, Haustiere oder der Mensch-zu-Mensch-Kontakt, eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen.

Dass der Erreger nur selten im Fleisch zu finden ist, liegt wahrscheinlich daran, dass er sich nur schwer gegen die natürliche Mikroflora durchsetzen kann. Aber er ist in der Lage, in rohem Schweinefleisch lange zu überleben (FUKUSHIMA und GOMYODA 1986). Infolge mangelhafter Küchenhygiene in den Haushalten kann es dann zur Kreuzkontamination kommen. Eine größere Gefahr als das Fleisch stellen die Innereien dar. BUCHER (2001) konnte auf dem Schlachthof kulturell auf 75% der Zungen, auf 70% der Herzen und auf 25% der Lebern *Y. enterocolitica* 4/O:3 nachweisen. Werden solche Innereien im Haushalt weiter verarbeitet und Messer oder Arbeitsfläche nicht ausreichend zwischengereinigt, scheint das Risiko einer Übertragung auf andere Lebensmittel, in denen eine Vermehrung möglich ist und die vor dem Verzehr nicht oder unzureichend erhitzt werden, sehr hoch zu sein. Der seltene Nachweis des Erregers im Fleisch kann aber auch auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen sein. So konnten bei allen Lebensmittelproben, die kulturell und mittels PCR untersucht wurden, mit der PCR höhere Prävalenzen festgestellt werden. Eine Übersicht ist bei FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA (2003) zu finden. Allerdings scheint ein PCR-Nachweis allein nicht so aussagekräftig zu sein, da die mittlere Infektionsdosis relativ hoch ist und somit eine Quantifizierung sinnvoll wäre.

Aufgrund der Ergebnisse von Fallkontrollstudien ist es sehr wahrscheinlich, dass Schweinefleisch oder Nebenprodukte vom Schwein eine wichtige Infektionsquelle darstellen (TAUXE et al. 1987, OSTROFF et al. 1994). Auch die Häufung von *Yersinia*-Ausbrüchen nach dem Verzehr von Chitterlings (eine afroamerikanische Festtagsspezialität, die aus rohen Schweinedärmen hergestellt wird) deutet auf das Schwein als Infektionsquelle hin (BOTTONNE 1999). Nicht zuletzt spricht für die Infektion über diese Tierart, dass in moslemischen Ländern, wo kein Schweinefleisch verzehrt werden darf, der Erreger nur selten isoliert werden kann (SAMADI et al. 1982).

Auch wenn im Schweinefleisch nicht häufig der Erreger nachzuweisen ist, so fordern doch die in anderen Arbeiten gefundenen starken Belastungen der Schlachtnebenprodukte und das häufige Auftreten des Erregers in den Schweinebeständen eine strenge Überwachung. Aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen kann gesagt werden, dass sich Kotuntersuchungen zu Beginn des letzten Mastdrittels gut eignen, um eine Aussage bezüglich der Häufigkeit des Erregers in einem Bestand zu treffen. Da momentan die Kenntnisse über die Epidemiologie des Erregers in Schweinebeständen noch zu gering sind und sich zur Zeit keine Möglichkeiten zur Zurückdrängung (wie z.B. Impfungen) auf Bestandsebene durchgesetzt haben, sollte vorerst weiter das Hauptaugenmerk bei der Schlachtung liegen. Stark belastete Betriebe sollten zum Schluß geschlachtet und deren Nebenprodukte nur hitzebehandelt in den Verkehr gebracht werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Absetzen des ungespaltenen Kopfes, in dem die Zunge und die Tonsillen verbleiben, die Kontaminationsgefahr von Tierkörper und Innereien deutlich senkt (CHRISTENSEN und LÜTHJE 1994).

Um Schweinefleisch sicherer zu machen, sollte in Zukunft versucht werden, die Epidemiologie des Erregers auf Bestandsebene durch Verlaufsuntersuchungen mit zeitlich kürzeren Intervallen genauer aufzuklären, um somit die Ursache der Erregerausbreitung zu erkennen und geeignete Gegenmaßnahmen ergreifen zu können. Vor allem die Praktikabilität von Impfungen zur Erregerzurückdrängung muß abgeklärt werden.

5.2 Vorkommen von *Campylobacter* spp. bei Schweinen

5.2.1 Kotproben in den Betrieben und auf dem Schlachthof

Wie zu erwarten war, konnten in den Betrieben hohe Erregerprävalenzen (bis zu 100%) gefunden werden. Nur Betrieb A stellte eine Ausnahme dar. Beim ersten Durchgang war keine Isolierung bei Sauen, Ferkeln, Läufern und Mastschweinen im Betrieb möglich. Lediglich auf dem Schlachthof konnte *C. coli* vier mal (2 x Oberfläche vor Kühlung, 2 x Kot) nachgewiesen werden. Die Stämme von der Tierkörperoberfläche könnten durch eine Kreuzkontamination dorthin gelangt sein. Aber die Isolate aus dem Kot müssen von einer Infektion aus dem Bestand stammen, da die Aufenthaltszeit auf dem Schlachthof von etwa zwei Stunden für eine Neuinfektion zu kurz war.

Im zweiten Durchgang gelang der Erregernachweis ab dem Läuferalter. Zu diesem Zeitpunkt war eines von 59 Tieren (1,9%) infiziert. Zum nächsten Untersuchungstermin, der etwa sechs Wochen später stattfand, war

ein anderes Schwein Erregerträger; das im Läuferalter positive Tier schied den Erreger nicht mehr aus. Als die Schweine nach sieben Wochen erneut untersucht wurden, konnte *C. coli* bei neun von 52 Tieren (17,3%) nachgewiesen werden. Hieran ist zu sehen, dass sich der Erreger unter Mastschweinen deutlich langsamer ausbreitet als unter Ferkeln. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die stabilere Darmflora älterer Tiere. Zum Schlachtzeitpunkt war der Erreger bei drei von 45 Tieren (6,7%) nachweisbar. Von den neun Schweinen, die beim zweiten Mastuntersuchungstermin positiv waren, sind vier zur Schlachtung gelangt. Bei keinem dieser Tiere konnte der Erreger nochmals isoliert werden. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Schweine wahrscheinlich in der Lage sind, den Erreger wieder zu eliminieren. Schon beim Ferkel ist ein mehrfacher Kontakt mit dem Erreger notwendig, damit er erfolgreich kolonisieren kann (HARVEY et al. 2000). Dieser intensive Kontakt wird in diesem Betrieb aufgrund des niedrigen Infektionsdrucks fehlen, so dass immer nur einige wenige Schweine infiziert sind und den Keim wieder eliminieren können. Das spricht dafür, dass es möglich ist, *Campylobacter* spp. in Mastbetrieben auf einem niedrigen Niveau zu halten, wenn die Tiere aus erregerfreien Beständen zugekauft werden. Auch WEIJTENS et al. (2000) beschrieben einen Sauenbestand, bei welchem die Erregerprävalenz sehr gering war (0-22% in einem Zeitraum von 22 Monaten). Dieser Betrieb begann die Zucht mit SPF-Tieren. Doch das Hygieneregime war nicht streng genug, um einen Erregereintrag verhindern zu können. Allerdings blieb die Prävalenz auf einem niedrigen Niveau. Als Ursache hierfür sahen die Autoren die stabilere Darmflora älterer Tiere und die Haltungsform an. Da die Sauen in Bügeln standen und ihre Köpfe in dieselbe Richtung wiesen, konnten sie kaum mit dem Kot anderer Tiere in Kontakt kommen. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen hatten aber die Mastschweine aufgrund der Gruppenhaltung Kontakt zum Kot ihrer Artgenossen. Somit scheint die stabilere Darmflora die Hauptursache für die Eingrenzung der Erregerausbreitung zu sein. Auch in einer Schweizer Studie wurde von einem erregerfreien Bestand berichtet (LEDERGERBER et al. 2003).

Die gefundenen hohen Prävalenzen, vor allem im Läufer- und Mastbereich (zwischen 63,6% und 88,9%) decken sich mit den Angaben in der Literatur (GÖRGEN et al. 1983, WEIJTENS et al. 1993, GAULL 2002). Auch sehr hohe Prävalenzen von über 90% zum Schlachtzeitpunkt, wie sie im Betrieb B festgestellt werden konnten, wurden bereits beschrieben (NESBAKKEN et al. 2002).

Ein nicht zu erwartendes Ergebnis zeigte sich im 3. Durchgang des Betriebes B. Hier waren zum Ferkel-2-Termin nur drei von 39 untersuchten Tieren (7,7%) positiv. Der Grund hierfür dürfte die zu spät erfolgte Probennahme sein. Normalerweise sind die Tiere kurz vor dem Absetzen untersucht worden und dann wieder kurz vor dem Ausstallen aus dem Läuferstall. Da die Untersuchung kurz vor dem Absetzen nicht möglich war, wurde sie vier Tage nach dem Absetzen im Läuferstall durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt bekamen die Tiere aber bereits eine Einstellungsprophylaxe mit Lincospectin premix (Lincomycin/Spectinomycin). Diese Substanzen haben eine gute Wirkung gegen gramnegative Keime und dürften somit bei vielen Tieren, die eine therapeutisch wirksame Menge mit den Futter aufnahmen, zur Eliminierung des Erregers geführt haben. Bereits drei Wochen später, als die Tiere erneut untersucht wurden (Läufer 1), war die Prävalenz wieder auf 76,9% angestiegen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die wenigen Schweine, die wahrscheinlich eine subtherapeutische Dosis der Antibiotika aufnahmen und den Erreger weiterhin

beherbergten, als neue Infektionsquelle nach Absetzen der antimikrobiell wirksamen Substanzen dienten. Dass einige Schweine den Erreger trotz der Antibiotikagabe weiter trugen, muß aber nicht mit Sicherheit durch die Aufnahme subtherapeutischer Dosen verursacht worden sein. Denkbar wäre auch das Überleben einzelner Keime auf belebten oder unbelebten Faktoren (z.B. an Fliegen, Nippeltränken und in kleinen Rissen im Boden, in welchen sich erregerhaltiger Kot befindet) oder das Überleben resistenter Stämme.

In allen Betrieben war zu beobachten, dass es sowohl kontinuierliche als auch intermittierende *C. coli*-Ausscheider gab. Diese inkontinuierliche Ausscheidung wurde auch von anderen Untersuchern beschrieben (WEIJTENS et al. 1999, GAULL 2002). Eine Erklärung für diese Erscheinung könnte die zeitweise Erregerfreiheit und eine folgende Reinfektion sein. WEIJTENS et al. (1999) halten diese Möglichkeit für nicht sehr wahrscheinlich, da in der Umgebung der Schweine ein sehr hoher Infektionsdruck herrscht. Des Weiteren konnten die Autoren vor und nach der Erregerfreiheit sehr hohe Keimzahlen nachweisen. Für wahrscheinlicher halten die Autoren eine intermittierende Ausscheidung, bei der die *Campylobacter*-Keime in Darmscheiden weiter vorhanden sind. Schon LEE et al. (1986) konnten im Mausmodell zeigen, dass der Erreger am Boden der Krypten akkumulieren und persistieren kann. Eine andere Untersuchung zeigte, dass der Erreger die Tendenz hat, sich im Darminhalt heterogen zu verteilen. Ursache hierfür ist die Chemotaxis zu Bestandteilen des Darmschleimes, vor allem zum Mucin. Somit kann der Erreger je nach Schleimmenge in unterschiedlich hoher Anzahl mit dem Kot ausgeschieden werden (HUGDAHL et al. 1988).

Alle im Kot gefundenen *Campylobacter*-Isolate konnten mit Hilfe der PCR als *C. coli* identifiziert werden. Auch bei vielen anderen Untersuchungen wurde diese Spezies ausschließlich isoliert (GÖRGEN et al. 1983, WEIJTENS et al. 1993 und 1997, GAULL 2002). Andere Autoren wiederum beschreiben ebenso die Isolierung von *C. jejuni*. So identifizierten STICHT-GROH (1982) und YOUNG et al. (2000) 23,4% bzw. 76,3% der gefundenen *Campylobacter*-spp. als *C. jejuni*. In diesen beiden Untersuchungen aber beruht die Differenzierung auf der Hippurathydrolyse, die zu falschen Ergebnissen führen kann. Da modernere Nachweismethoden zur Speziesdifferenzierung wie die PCR zur Verfügung stehen, sollten diese immer der Hippurathydrolyse vorgezogen werden. Aber es ist ebenso möglich, dass in einzelnen Betrieben oder geographischen Regionen *C. jejuni* auch beim Schwein keine Seltenheit ist.

5.2.2 Tonsillen, Lymphknoten, Schlachtkörperoberfläche

Trotz der hohen Prävalenzen im Kot werden in der Literatur zumeist nur recht geringe Isolationsraten von der Schlachttieroberfläche beschrieben. Diese liegen zwischen 2,9% und 36,5% (KWIATEK et al. 1990, GAULL 2002, NESBAKKEN et al. 2002, PEARCE et al. 2003). In dieser Arbeit waren vor der Kühlung auf der Oberfläche Prävalenzen in den in der Literatur angegebenen Bereichen zu finden (zwischen 4,0% und 27,8%). Eine Ausnahme bildete nur der Betrieb C. Neun Tiere aus diesem Betrieb wurden nicht auf dem Schlachthof, sondern in einer kleinen privaten Fleischerei geschlachtet. Bei acht (88,9%) dieser Tiere konnte *C. coli* von der Oberfläche isoliert werden. Dieser Fund deutet darauf hin, dass in diesem kleinen

Schlachtbetrieb möglicherweise ein geringerer hygienischer Standard als auf einem größeren Schlachthof herrschte und eine sehr starke Kreuzkontamination möglich war.

Campylobacter spp. sind nach dem Kühlprozess zumeist nicht mehr nachweisbar (CHANG et al. 2003, PEARCE et al. 2003). Aber eine andere Untersuchung zeigte auch, dass nach der Kühlung ebenso hohe Prävalenzen vorkommen können. So fanden GEBREYES et al. (2003) nach der Kühlung auf 29% der Karkassen von Schweinen aus sechs Betrieben *Campylobacter*-spp. In einem Betrieb wurde sogar eine Prävalenz von 100% vor und nach der Kühlung beschrieben. Es ist bekannt, dass *Campylobacter*-spp. auf Geflügelhaut die Kühlung gut überstehen können, da diese faltig und feucht ist und auch die Follikel Nischen zum Überleben darstellen (CHANTARAPANONT et al. 2003). Auf Schweinehaut, die eine relativ glatte Oberfläche aufweist und während des Kühlprozesses gut abtrocknet, scheinen Nachweise von so hohen Prävalenzen zweifelhaft. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnten bei sechs der sieben Durchgänge nach der Kühlung keine *Campylobacter*-Keime mehr nachgewiesen werden. Nur im zweiten Untersuchungsdurchgang des Betriebes B waren auf dem Schlachttierkörper nach der Kühlung in 4,8% (drei von 62) der Proben *C. jejuni* nachweisbar. Diese Spezies konnte bereits vor der Kühlung isoliert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren *Campylobacter*-Keime auf zehn von 62 (16,1%) Karkassen zu finden, die Hälfte konnte als *C. coli* und die andere Hälfte als *C. jejuni* identifiziert werden. Dieser Durchgang war der einzige, bei welchem *C. jejuni* isoliert werden konnte. Unklar bleibt der Ursprung dieses Keimes, da in den Kotproben im Bestand und in Proben des Kotes, der Tonsillen und der Lymphknoten auf dem Schlachthof nur *C. coli* isoliert werden konnte.

Aus den 179 Umgebungsproben, die im Zerlegebereich nach der Kühlung genommen wurden, war die Isolierung von *Campylobacter*-spp. nur ein einziges Mal möglich (Schuhsohle eines im Zerlegebereich tätigen Mitarbeiters). Es ist aber viel wahrscheinlicher, dass dieser Keim bereits auf den Weg dorthin „mitgenommen“ wurde, als dass er auf dem trockenen Fußboden des Zerlegebereiches bei den dort herrschenden niedrigen Temperaturen und der hohen Sauerstoffspannung überlebt hat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass offenbar der Kühlprozess der Schweineschlachttierkörper und die damit verbundene Trocknung der Hautoberfläche die Anzahl der *Campylobacter*-Keime signifikant ($p = 0,006$) reduziert und damit sehr gut geeignet ist, das Risiko des Eintrags dieses Krankheitserregers in die Lebensmittelkette zu minimieren. Ein Restrisiko bleibt aber aufgrund des möglichen VBNC-Status. In diesem Status lassen sich die Keime nicht anzüchten, sie sind aber lebensfähig. Somit kann ein möglicher Nachweis nur über molekularbiologische Methoden geschehen. Eine PCR auf DNA-Ebene ist aber in diesem Falle nicht geeignet, da im positiven Falle auch nicht entschieden werden kann, ob der Erreger noch lebte. Zum Nachweis lebensfähiger, nicht kultivierbarer Keime wäre jedoch eine RT-PCR auf Ebene der mRNA, welche nur von lebenden Zellen synthetisiert wird, geeignet.

5.2.3 Infektionsquellen

Für die erfolgreiche Kolonisierung des Erregers ist eine mehrfache Exposition der Schweine zu dem Erreger Voraussetzung. Die Übertragung von Tier zu Tier stellt den wichtigsten Infektionsweg dar. Es konnte bereits

gezeigt werden, dass sich die Ferkel bei der Mutter infizieren (WEJTENS et al. 1997, GAULL 2002). Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen war zu beobachten, dass die Ferkel von als positiv getesteten Sauen oft schon zum ersten Untersuchungstermin, zirka drei Tage nach der Geburt, den Erreger ausschieden. Vereinzelt war auch bei den Ferkeln negativer Sauen zu diesem frühen Untersuchungstermin der Erreger nachweisbar. Als Ursache hierfür ist eine Keimverschleppung durch das Personal denkbar. Binnen der ersten 24 Stunden können die Ferkel zu 100% kolonisiert werden (YOUNG et al. 2000). Oft ist aber für die Durchseuchung des Wurfes ein Zeitraum von mehreren Wochen notwendig (GÖRGEN et al. 1983, WEJTENS et al. 1997). Auch bei diesen Untersuchungen war die Nachweisrate zu einem späteren Zeitpunkt (Ferkel 2) höher als kurz nach der Geburt (Ferkel 1).

Als mögliche Eintragsquellen in den Bestand werden auch Futter, Wasser und belebte Vektoren wie Insekten oder Schadinsekten in der Literatur genannt. In diesen Untersuchungen konnten in Futterproben keine *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden (MECHTHILD LINNEBUR, Berlin, April 2004). Auch im Wasser war der Erreger nicht zu finden. Allerdings gelang die Isolation von Nippeltränke und Wassertrog. Die Genotypisierung dieser Isolate zeigte eine sehr enge Verwandtschaft zu den Schweinestämmen. Es scheint aber wahrscheinlicher, dass die Tränkvorrichtungen durch die Schweine kontaminiert wurden, als dass das Wasser als Infektionsquelle fungierte. Auch von Fliegen konnte *C. coli* isoliert werden. Diese Stämme zeigten ebenso eine starke Homologie zu den Schweinestämmen. Über Insekten scheint die Übertragung zu anderen Beständen durchaus wahrscheinlich.

Eine Verabreichung einer Einstallungsprophylaxe scheint das häufige Auftreten des Erregers nicht beeinflussen zu können (WEJTENS et al. 1993). *C. coli* war in zwei Betrieben (B und C), die eine Einstallungsprophylaxe durchführten, sowie in dem Betrieb mit ökologischer Haltung (D), bei welchem keine präventiven Antibiotika eingesetzt werden, bei einer Vielzahl der Tiere nachweisbar. Ebenso führte der Betrieb A eine Einstallungsprophylaxe durch, hier konnte der Erreger jedoch nur sehr selten isoliert werden. Aber unmittelbar zum Zeitpunkt der Verabreichung dieser Prophylaxe scheinen *Campylobacter*-spp. stark zurückgedrängt zu werden (Betrieb B, 2. Durchgang; siehe auch 5.2.1). Da nur ein einziges Mal zu diesem Zeitpunkt Proben genommen worden sind, muss sich diese Aussage erst noch bestätigen.

Das Alter der Stallungen und der damit verbundene steigende Infektionsdruck scheinen keinen Einfluss auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. zu haben. In dem seit 1993 genutzten Maststall des Betriebes A war der Erreger nur bei einigen wenigen Tieren nachweisbar, in dem jüngsten Maststall hingegen (Betrieb D, seit 2002 in Nutzung) war er bei fast allen Schweinen zu finden. Auch die Art des Futters (hofeigen/Zukauf) und die Herkunft des Tränkwassers (Brunnen/Leitungswasser) hatten hier keinen Einfluss auf die Erregerprävalenz.

5.2.4 Genotypisierung

Die AFLP hat sich bereits mehrfach als sehr gut geeignet für die molekularbiologische Differenzierung verschiedener *Campylobacter*-Stämme erwiesen (DUIM et al. 1999, 2000 und 2001, GAULL 2002). Wie in anderen Untersuchungen war auch hier innerhalb eines Betriebes eine große genetische Vielfalt festzustellen.

(WEIJTENS et al. 1993 und 1999, GAULL 2002). Diese genetische Vielfalt beruht auf dem variablen Genom dieser Bakterienart. Die Genotypen der untersuchten Umgebungsproben clusterten in die Schweinegenotypen. Nur im Betrieb A war das Fliegenisolat keinem Schweinecluster zuordenbar. Der Nachweis eng verwandter Genotypen in den Umgebungsproben und im Schweinekot ist sicher auf die Kontamination der Umgebung durch die Schweineexkremente zurückzuführen. Beispielsweise ist es nicht unüblich, dass die Tiere Koprophagie zeigen. Ist der Kot erregerrhaltig, wird die Maulhöhle kontaminiert. Bei der Wasseraufnahme kann somit der Erreger auf die Nippeltränke oder in den Wassertrog eingebracht werden. Ebenso ist es bei der Fliege des Betriebes B wahrscheinlich, dass sie Kontakt zum Schweinekot hatte und folglich einen Genotyp des Bestandes auf ihrem Exoskelett trug. Die im Betrieb A gefangene Fliege bildete ein eigenes Cluster. Aber die Homologie zu den Stämmen des Bestandes lag dennoch bei 84%, so dass man von einer engen Verwandtschaft sprechen kann. Es wäre denkbar, dass der Keim bereits so lange an der Fliege haftete, dass er die Möglichkeit hatte, sein Genom etwas zu verändern. Vorstellbar ist auch, dass die Fliege den Erreger in einem der drei weiteren Stallabteile aufnahm und dort ein etwas anderer Genotyp zu finden ist. Andererseits ist es aber auch möglich, dass die Fliege diesen Genotyp aus der Umwelt in den Bestand eingetragen hat.

Der Vergleich der Genotypen auf dem Schlachthof zeigte ebenso eine größere Variabilität. Bei einzelnen Tieren waren sehr eng verwandte Stämme zugleich aus Kot und Tonsillen isolierbar, bei der Mehrzahl aber waren die Stämme aus Kot, Tonsillen und Oberfläche verschieden. Als Ursache dafür, dass auf der Oberfläche oft andere Genotypen als in Kot oder Tonsillen gefunden werden, ist eine Kreuzkontamination denkbar. Beispielsweise werden von dem Schlachthofmitarbeiter, der die Reste des Rachenringes am Schlachttierkörper entfernt und damit zwangsläufig mit dem hochkontaminierten Tonsillenbereich in Kontakt kommt, auch andere Karkassen berührt. Bei kritischer Betrachtung muß aber ergänzt werden, dass bei diesen Untersuchungen nur eine Kolonie pro Probe genotypisiert wurde. Da bekannt ist, dass Schweine gleichzeitig mehrere Genotypen mit dem Kot ausscheiden können, ist es denkbar, dass noch häufiger sehr eng verwandte Genotypen in Kot, Tonsillen und auf der Oberfläche zu finden sind.

Einmal konnte auch der identische Stamm von der Tonsille eines Tieres und von der Oberfläche des daneben hängenden Tieres isoliert werden. Das bestätigt die Möglichkeit der Kreuzkontamination bei dicht aneinanderhängenden Tieren. Für die Häufigkeit von Kreuzkontaminationen spricht auch die enge Verwandtschaft vieler von der Oberfläche isolierter Stämme. So trugen sieben der neun Schweine (Nr. 3-9, Abb. 6) des Betriebes C, die in der privaten Fleischerei geschlachtet wurden, hoch verwandte *C. coli*-Stämme (über 90% Homologie) auf ihrer Oberfläche. Zu bemerken ist, dass die benutzten Messer nach der Schlachtung eines Schweines und der Bearbeitung des Schlachttierkörpers nicht zwischengereinigt wurden.

5.2.5 Schweinefleisch als Infektionsquelle für den Menschen

Etwa 90% der humanen Campylobacteriosen werden durch *C. jejuni* verursacht (TAM et al. 2003). Als Ursache hierfür wird vor allem die hohe Belastung von Geflügelfleisch mit diesem Erreger angesehen. Die

Infektionsquelle für die humanen *C. coli*-Infektionen ist unklar. Sehr häufig kann dieser Erreger vom Schwein isoliert werden, aber auch bei Puten wurde er bereits mehrfach nachgewiesen. Trotz der hohen Isolierungsraten aus Kot- und Tonsillenproben beim Schwein ist das Fleisch dieser Tierart kaum belastet. Ursache hierfür dürfte die effiziente Kühlung der Karkassen sein. Die Schweinehaut ist, im Gegensatz zur Geflügelhaut, sehr glatt und trocken und bietet somit dem Erreger, der sehr empfindlich gegenüber Austrocknung ist, kaum Nischen zum Überleben.

Da *Campylobacter*-Infektionen oft sporadisch als Einzelerkrankungen auftreten, wird die Suche nach der Infektionsquelle noch komplizierter. Das Lebensmittel Schweinefleisch ist nicht als Infektionsquelle für den Menschen auszuschließen. Da *Campylobacter*-Keime in der Lage sind, den VBNC-Status einzunehmen (siehe auch 5.2.2), kann die Frage des Überlebens des Erregers auf der Schlachttierkörperoberfläche nicht völlig geklärt werden. Über die Mechanismen und Bedeutung des VBNC-Status bei *Campylobacter* spp. sollten weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

5.3 Schlußfolgerungen aus Sicht des Verbraucherschutzes

Für Yersinien scheint derzeit eine Bekämpfung des Erregers auf Bestandesebene noch sehr schwierig zu sein, da viele Fragen bezüglich der Epidemiologie weiterhin offen bleiben. Es ist unklar, warum sich der Erreger in manchen Mastbetrieben so stark ausbreitet, in anderen Mastbetrieben wiederum nicht, obwohl ihn auch einzelne Schweine tragen. Auch über die Eintragsquellen ist zu wenig bekannt, als dass an dieser Stelle gezielt Interventionsmaßnahmen ergriffen werden könnten. Außerdem scheint es so, dass externe Quellen nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Sinnvoll wäre die Einführung von Monitoringprogrammen in den Beständen, um stark belastete Herden von den übrigen abzugrenzen. Eine Risikominimierung scheint momentan nur auf dem Schlachthof möglich zu sein. So sollten die mit Yersinien belasteten Herden erst zum Schluss geschlachtet werden. Ebenso ist die Optimierung der Hygiene auf dem Schlachthof ein essentieller Bestandteil für die Erzeugung eines sicheren Lebensmittels. Auch regelmäßige Schulungen des Schlachthofpersonals sollten durchgeführt werden, um das Hygienebewusstsein der Mitarbeiter zu verbessern (BUCHER 2001). Des Weiteren muß die Bevölkerung, ähnlich wie bei der Salmonellenproblematik, bezüglich der Gefahren, die vom Umgang mit rohem Schweinefleisch und vor allem mit Innereien ausgehen, aufgeklärt werden. Besonders die Risiken, die von einer Kreuzkontamination ausgehen, scheinen vom Verbraucher unterschätzt zu werden. Dafür sprechen auch die vielen Kleinkinderkrankungen. In diesem Alter ist es unwahrscheinlich, dass die Kinder rohes oder unzureichend erhitztes Schweinefleisch zu essen bekommen. Wahrscheinlicher ist es, dass die Kindernahrung auf nicht ausreichend gereinigten Arbeitsflächen oder mit unzureichend gereinigten Küchenutensilien zubereitet wurde.

Über die Epidemiologie von *Campylobacter*-spp. ist Vieles bekannt. Hier stellt sich vielmehr die Frage, ob eine Bekämpfung überhaupt notwendig oder sinnvoll wäre. Es scheint möglich zu sein, den Erreger in den Beständen auf einem niedrigen Niveau zu halten. Um aber erst einmal erregerefreie Bestände zu erhalten,

müssten neue Herden mit SPF-Tieren aufgebaut werden. Die bisher genutzten Stallungen wären gründlich zu reinigen, zu desinfizieren und möglichst erst nach einiger Zeit neu zu belegen. Diese Maßnahmen wären mit erheblichen Kosten für die Landwirte verbunden. Da das Schwein als Infektionsquelle für die humanen Erkrankungen wahrscheinlich nur eine geringe Bedeutung hat, scheinen so aufwändige Maßnahmen wie Bestandssanierungen nicht sinnvoll zu sein. Auch wenn viele Herden sehr stark belastet sind, so ist der Erreger im Fleisch jedoch nur selten zu finden. Hier scheinen der Kühlprozess nach der Schlachtung und die damit verbundene Abtrocknung der Oberfläche sowie der Sauerstoffeinfluss ausreichend zu sein, um das Risiko zu minimieren. Doch auch für diesen Erreger gilt, dass der Verbraucher noch besser aufgeklärt werden muss. Vor allem über die Gefahr, die vom Geflügelfleisch und möglicherweise auch vom Schweinefleisch in Kombination mit schlechter Küchenhygiene ausgeht, muss der Verbraucher noch umfassender informiert werden. Beispielsweise konnte in einem Experiment gezeigt werden, dass von Händen, die mit rohem Geflügelfleisch Kontakt hatten, noch nach drei Minuten von 55% (30 von 58) der Hände *C. jejuni* isoliert werden konnte. Auch bei 50% (38 von 76) der Schneidebrettchen, auf welchen rohes Geflügel zerlegt wurde, war *C. jejuni* nachweisbar (DE BOER und HAHNÉ 1990).

Für beide Erreger gilt, dass die Einhaltung elementarer hygienischer Maßnahmen zur Senkung des Infektionsrisikos von grundsätzlicher Bedeutung ist. Hierunter fällt nicht nur die Hygiene im Küchenbereich, sondern auch beispielsweise die gründliche Händereinigung nach dem Umgang mit Heimtieren, die ebenso Erregerträger sein können, oder nach dem Toilettenbesuch, da es bekannt ist, dass auch der Mensch ein symptomloser Ausscheider sein kann. Dass viele Personen bereits Kontakt zu Yersinien hatten, zeigen die hohen Seroprävalenzen. In Deutschland haben bis zu 40% der Bevölkerung einen Antikörpertiter gegen Yersinien (NEUBAUER et al. 2001b). Somit sollte auch der Mensch als Infektionsquelle nicht unberücksichtigt bleiben.

6 Zusammenfassung

Verlaufsuntersuchungen zum Vorkommen potentiell humanpathogener *Yersinia enterocolitica* und *Campylobacter* spp. in Schweinebeständen von der Geburt bis zur Schlachtung sowie Genotypisierung ausgewählter Isolate.

Sandra Kasimir

Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Oktober 2004

Schlüsselwörter: *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* ssp., Schwein, Prävalenzen, Epidemiologie, Genotypisierung

138 Seiten, 35 Tabellen, 7 Abbildungen, 371 Literaturangaben, 1 Anhang

Campylobacter (C.) spp. und *Yersinia* (Y.) *enterocolitica* sind in Deutschland nach den Salmonellen die häufigsten Erreger der Enteritis infectiosa. Das Schwein wird als Reservoirtier für *C. coli* und *Y. enterocolitica* Bioserovar 4/O:3 angesehen. Da diese Infektionen beim Schwein zumeist klinisch inapparent verlaufen, sind sie bei der Schlacht tier- und Fleischuntersuchung nicht feststellbar. Die Erreger können somit unerkannt in die Lebensmittelkette gelangen. In dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur Epidemiologie dieser Erreger geleistet werden. Dazu wurden Prävalenzdaten in Betrieben und zum Schlachtzeitpunkt erhoben, Eintragungsquellen gesucht und genotypische Vergleiche durchgeführt.

Im Zeitraum von Mai 2002 bis März 2004 wurden in vier verschiedenen Betrieben Verlaufsuntersuchungen zum Vorkommen dieser beiden Erreger durchgeführt. Dafür wurden Schweine von ihrer Geburt bis zur ihrer Schlachtung verfolgt. In drei dieser vier Betriebe wurden die Schweine konventionell, in einem ökologisch gehalten. Für die Untersuchungen wurden jeweils 100 Ferkel drei Tage nach ihrer Geburt mit einer Ohrmarke gekennzeichnet. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte eine erste Kotprobenentnahme mittels eines sterilen Tupfers. Die Tiere mit den Marken 1-40 wurden auf *Campylobacter* spp. und *Y. enterocolitica*, die mit den Nummern 41-100 nur auf *Y. enterocolitica* untersucht. Eine zweite Untersuchung der Ferkel erfolgte kurz vor dem Absetzen. An diesen beiden Terminen wurden auch die Muttersauen beprobt. Nur in dem Ökobetrieb war eine Sauenuntersuchung aufgrund der Haltungsform nicht möglich. Weitere Untersuchungen wurden kurz vor dem Ausstallen aus dem Läuferstall, im Maststall und auf dem Schlachthof durchgeführt. Für den Nachweis von *Y. enterocolitica* wurden die Proben in ITC angereichert und auf CIN-Agar ausgestrichen. Bolton-Bouillon und mCCD-Agar wurden für die Anzucht der *Campylobacter*-Keime genutzt.

Wie zu erwarten war, konnten hohe Prävalenzen (bis zu 100%) von *C. coli* nachgewiesen werden. Vor allem kurz vor dem Absetzen wurde der Erreger häufig isoliert. Aber es gab auch einen Betrieb, wo der Nachweis nur im Maststall und nur bei sehr wenigen Tieren gelang.

Nicht nur in den Betrieben, sondern auch auf dem Schlachthof waren hohe Prävalenzen festzustellen. Vor allem aus dem Kot und aus den Tonsillen konnte der Erreger häufig isoliert werden. Auch die Schlachttierkörperoberfläche war häufig stark kontaminiert. Nach der Kühlung jedoch konnte der Erreger nur bei 3 von 443 (0,7%) untersuchten Tieren nachgewiesen werden. Zu bemerken ist, dass es sich hierbei nicht um *C.coli*, sondern um *C. jejuni* handelte. Auch aus einigen Umgebungsproben der Betriebe konnte *C. coli* isoliert werden. Die Genotypen dieser Isolate wurden mit den Genotypen zeitgleich isolierter Schweinestämme verglichen. Als Methode hierfür wurde die AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) genutzt. Dabei konnte eine enge Verwandtschaft von Schweine- und Umgebungsproben beobachtet werden.

In zwei der vier Betriebe konnte *Y. enterocolitica* aus Kotproben isoliert werden. Der Nachweis gelang aber nur im Maststall. Hier konnten im Kot sehr hohe Prävalenzen (bis zu 65,4%) nachgewiesen werden. Sauen, Ferkel und Läufer wurden immer als negativ getestet. Zum Schlachtzeitpunkt gelang die Isolierung sehr häufig aus den Tonsillen, im Kot war der Erreger zu diesem Zeitpunkt kaum noch nachzuweisen. Alle Isolate gehörten dem humanpathogenen Bioserovar 4/O:3 an, nur eines wurde als 3/O:9 identifiziert. Aus den 458 untersuchten Umgebungsproben konnte *Y. enterocolitica* nicht isoliert werden.

Des Weiteren wurde mittels einer PCR untersucht, ob die isolierten Yersinien ein Virulenzplasmid beherbergen. Dieses ist notwendig, um eine volle Pathogenität auszubilden. Von insgesamt 263 isolierten Stämmen konnten 236 Stämme (89,7%) als plasmidtragend identifiziert werden. Auffallend war hierbei, dass 110 von 111 Stämmen (99,1%), die im Maststall isoliert wurden, das Plasmid besaßen. Im Gegensatz dazu konnte bei den Schlachthofisolaten das Plasmid nur bei 126 von 152 Stämmen (82,9%) nachgewiesen werden.

Einige Isolate eines Betriebes wurden mit Hilfe der PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) unter Nutzung des Restriktionsenzym *NotI* genotypisiert. Wie in der Literatur beschrieben, war innerhalb eines Bestandes auch nur ein Genotyp zu finden. Auch die Isolate aus Kot und Tonsillen waren klonal. Ebenso waren plasmidtragende nicht von plasmidlosen Stämmen zu unterscheiden.

Auch wenn fast alle Herden stark mit *Campylobacter* spp. belastet sind, scheint aus Sicht des Verbraucherschutzes eine Bekämpfung auf Bestandesebene nicht notwendig zu sein, da die Kühlung des Schlachtkörpers den sauerstoff- und austrocknungsempfindlichen Erreger offensichtlich sehr effektiv zurückdrängt. Anders verhält es sich bei den Yersinien. Obwohl im Schweinefleisch nur relativ selten der Erreger nachweisbar ist, so sind Schlachtnebenprodukte oft stark belastet. Vor allem durch Kreuzkontaminationen im Küchenbereich der privaten Haushalte geht vom Fleisch und von den Nebenprodukten eine nicht zu unterschätzende Gefahr aus. Da über die Epidemiologie des Erregers auf Bestandesebene noch relativ wenig bekannt ist, kann er momentan nur auf Schlachthofebene durch Einhaltung einer strikten Hygiene in seiner Ausbreitung begrenzt werden. Auf Bestandesebene scheint die Einführung von Monitoringprogrammen sinnvoll, um stark belastete Herden zu erkennen, diese möglichst am Schluss zu schlachten und somit das Lebensmittel Schweinefleisch sicherer zu machen.

7 Summary

Follow-up investigations on the occurrence of potentially human pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in swine herds from birth to slaughter and genotyping of selected isolates.

Sandra Kasimir

Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in October 2004

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., pig, prevalences, epidemiology, genotyping

138 pages, 35 tables, 7 figures, 371 references, 1 appendix

Campylobacter (*C.*) spp. and *Yersinia* (*Y.*) *enterocolitica* are, after *Salmonella*, the most common causes of human infectious enteritis in Germany. Pigs are thought to be a reservoir for *C. coli* and *Y. enterocolitica* bioserotype 4/O:3. In pigs, these infections are clinically inapparent and so it is not possible to detect them during ante- and postmortem inspection. This way, these bacteria may remain in the food chain. This work should be a contribution to the epidemiology of these microorganisms. Therefore, prevalences on farm level and at the time of slaughter have been determined, sources of infection were identified and genotypes were compared.

Between May 2002 and March 2004 follow-up investigations regarding these two microorganisms were performed in four pig farms. In three of these four farms the pigs were housed in a conventional way, the fourth farm produced according to organic aspects. For the investigations, 100 piglets were marked by an eartag three days after birth. On this day, also the first faecal samples were taken by using sterile swabs. Piglets, which had an eartag number between 1 to 40 were examined for both, *Y. enterocolitica* and *Campylobacter* spp., the numbers 41 to 100 only for *Y. enterocolitica*. The piglets were inspected once again shortly before weaning. The mother sows were examined on these two dates, too. Only in the organic farm, an examination of the sows was not possible. The pigs were examined shortly before moving to the fattening stable and also in the fattening stable and at the time of slaughter.

For the detection of *Y. enterocolitica* the samples were enriched in ITC broth and plated on CIN agar. Bolton broth and mCCD agar were used for the isolation of *Campylobacter* spp.

As expected, high prevalences (up to 100%) of *C. coli* could be detected. Above all, shortly before weaning the microorganism could be isolated most frequently. But there was also one farm where *Campylobacter* spp. could only be detected in the age of fattening and only in few animals.

There where high prevalences not only at farm level, but also in the abattoir *Campylobacter* spp. could often be detected. Above all, the bacteria were isolated from faeces and from tonsils. Also the carcasses were often contaminated. However, after chilling the bacteria could be detected only on 3 out of 443 (0.7%) carcass surfaces. It is remarkable, that these isolates did not belong to the species *C. coli* but to *C. jejuni*.

Also in some environmental samples *C. coli* could be found. The genotypes of these isolates were compared with the genotypes of porcine isolates sampled at the same time. Therefore, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) was used. A close relationship between porcine and environmental samples could be observed.

In two of the four farms, *Y. enterocolitica* was found in faecal samples. But the isolation was only successful in the age of fattening. There were prevalences up to 65.4% in the fattening stable. In sows, piglets and weaners no yersiniae could be detected. At the time of slaughter, the tonsils were often highly contaminated, but in the faecal samples these bacteria were rarely detectable. All isolates belonged to the human pathogenic bioserotype 4/O:3, only one was identified as 3/O:9. In none of the 458 examined environmental samples *Y. enterocolitica* was present.

Furthermore, the *Yersinia* isolates were screened for the presence of a virulence plasmid. This plasmid is essential for full pathogenicity. Out of 263 isolated strains, 236 (89.7%) were plasmid-harboring. It was striking that 110 out of 111 strains (99.1%) which were isolated in the fattening stable carried this plasmid. In contrast, only in 82.9% (126 out of 152) of the strains isolated in the abattoir the plasmid could be detected.

Some isolates of one farm were genotyped with PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) by using the restriction enzyme *NotI*. As already described in literature, only one genotyp was found in a farm. Also the strains isolated from faeces and tonsils were identical. It was not possible to distinguish plasmid-bearing strains and strains without plasmid.

Although nearly all herds are colonized with *Campylobacter* spp., a combat of this microorganism seems not to be necessary from the vantage point of consumer protection, because the chilling process seems to be very effective in pushing back this oxygen- and coldness-sensitive organism. This is differently from *Yersinia*. Although the bacteria is rare in pork, offal is often highly contaminated. Above all, there is a hazard based on cross contamination between pork or offal and other products in the kitchens of private households. Because there is only few knowledge about the epidemiology of *Yersinia* on farm level, the spread of this bacteria can only be limited during slaughtering by adherence of a strict hygienic regime to date. On farm level, the implementation of monitoring programs could be useful to detect high polluted herds. Such herds should be logistically slaughtered at last for making pork safer.

8 Literaturverzeichnis

Abatay HI, Corry JEL. The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. J Appl Microbiol. 1998;84:733-40.

Ackers ML, Schoenfeld S, Markman J, Smith MG, Nicholson MA, Dewitt W, Cameron DN, Griffin PM, Slutsker L. An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk. J Infect Dis. 2000;181:1834-7.

Aldova E, Svandova E. *Yersinia enterocolitica* O:3 findings on porcine tongues in comparison with Yersiniosis incidence in man in Czechoslovakia. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1984;28:319-29.

Aleksic S. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* antigens O:3, O:9 and O:8 in different *Yersinia* species, their corresponding H antigens and origin. Contrib Microbiol Immunol. 1995;13:89-92.

Aleksic S, Bockemühl J. Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. Immun Infekt. 1990;18:178-85.

Aleksic S, Bockemühl J. Untersuchungen von *Yersinia*-Stämmen aus Deutschland, 1993-1994. Bundesgesundheitsbl. 1996;3:94-7.

Aleksic S, Steigerwalt AG, Bockemühl J, Huntley-Carter GP, Brenner DJ. *Yersinia rhodei* sp. nov. isolated from human and dog feces and surface water. Int J Syst Bacteriol. 1987;37:327-32.

Al-Hendy A, Toivanen P, Skurnik M. Lipopolysaccharide O side chain of *Yersinia enterocolitica* O:3 is an essential virulence factor in an orally infected murine model. Infect Immun. 1992;60:870-75.

Allerberger F, Al-Jazrawi N, Kreidl P, Dierich MP, Feierl G, Hein I, Wagner M. Barbecued chicken causing a multi-state outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. Infection. 2003;31:19-23.

Altekruse SF, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni* and related organisms. In: Cliver DO, Riemann HP, editors. Foodborne Diseases. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier Science; 2002: pp. 103-12.

Altekruse SF, Swerdlow DL, Stern NJ. Microbial food borne pathogens. *Campylobacter jejuni*. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1998;14:31-40.

Alter T, Fehlhäber K. Use of AFLP analysis for the molecular biological fine typing of *Campylobacter jejuni* strains from turkey flocks. Berl Münch Tierärztl Wochenschrift. 2003;116:454-9.

Andersen JK. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Int J Food Microbiol. 1988;7:193-202.

Anonymus. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 258. Aufl. Pschyrembel W, Hildebrandt H, Hrsg. Berlin: De Gruyter; 1998

Anonymus. Robert-Koch-Institut. Zwei Gruppenerkrankungen durch *C. jejuni* nach dem Verzehr von Rohmilch. Epid Bull. 1997;50:353-57.

Anonymus. Robert-Koch-Institut. Ratgeber Infektionskrankheiten; 7. Folge: *Campylobacter*-Infektionen. Epid Bull. 1999a;35:259-62.

Anonymus. Robert-Koch-Institut. Stellungnahme des Arbeitskreises Blut; *Yersinia enterocolitica*. 1999b (zitiert vom 04.04.2004)

<<http://www.rki.de/GESUND/AKBLUT/BLUT.HTM?/GESUND/AKBLUT/STELL/ST05.HTM&1>>

Anonymus. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für das Jahr 1999. Berlin; 2000a.

Anonymus. Freistaat Sachsen, Staatsministerium für Soziales, Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen: Jahresbericht 1999. Dresden; 2000b.

Anonymus. Robert-Koch-Institut. Zwei Gastroenteritis-Ausbrüche durch *C. jejuni* nach dem Genuss von Rohmilch. Epid Bull. 2000c;18:143-5.

Anonymus. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für das Jahr 2000. Berlin; 2001a.

Anonymus. Freistaat Sachsen, Staatsministerium für Soziales, Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen: Jahresbericht 2000; Dresden 2001b.

Anonymus. First case of enteritis caused by *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8, biovar 1B in Germany. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe, Newsletter 2002a;73:5-6.

Anonymus. Robert-Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001; Berlin 2002b.

Anonymus. Freistaat Sachsen, Staatsministerium für Soziales, Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen: Jahresbericht 2001; Dresden 2002c.

Anonymus. Robert-Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002; Berlin 2003a.

Anonymus. Freistaat Sachsen, Staatsministerium für Soziales, Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen: Jahresbericht 2002; Dresden 2003b.

Anonymus. AFLP® - Genetic Fingerprinting. 2004a (zitiert vom 03.06.04)
<http://www.keygene.com/technologies/technologies_aflp.htm>

Anonymus. Fleischerei Ticker. 2004b (zitiert vom 14.05.2004)
<<http://www.fleischerei.de/121700.html>>

Anonymus. Robert-Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003; Berlin 2004c.

Anonymus. Freistaat Sachsen, Staatsministerium für Soziales, Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen: Jahresbericht 2003; Dresden 2004d.

Arnold T, Hensel A, Hagen R, Aleksic S, Neubauer H, Scholz HC. A highly specific one-step PCR-assay for the rapid discrimination of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* from pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. Syst Appl Microbiol. 2001;24:285-9.

Arnold T, Neubauer H, Nikolaou K, Roesler U, Hensel A. Identification of *Yersinia enterocolitica* in minced meat: a comparative analysis of API 20E, *Yersinia* identification kit and a 16S rRNA-based PCR method. J Vet Med B. 2004;51:23-7.

Aspinall ST, Wareing DRA, Hayward PG, Hutchinson DN. A comparison of a new *Campylobacter* selective medium (CAT) with membrane filtration for the isolation of thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. J Appl Bacteriol. 1996;80:645-50.

- Asplund K, Johansson T, Siitonen A. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments in the discrimination of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Epidemiol Infect.* 1998;121:579-86.
- Asplund K, Tuovinen V, Veijalainen P, Hirn J. The prevalence of *Yersinia enterocolitica* O:3 in Finnish pigs and pork. *Acta Vet Scand.* 1990;31:39-43.
- Aulisio CCG, Mehlmann IJ, Sanders AC. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from food. *Appl Environ Microbiol.* 1980;39:135-40.
- Bang DD, Wedderkopp A, Pedersen K, Madsen M. Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (*hipO*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *Mol Cell Probes.* 2002;16:359-69.
- Bartley TD, Quan TJ, Collins M, und Morrison SM. Membrane filter technique for the isolation of *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol.* 1982;43:829-34.
- Baylis C, MacPhee S, Martin KW, Humphrey TJ, Betts RP. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *J Appl Microbiol.* 2000;89:884-91.
- Bercovier H, Brault J, Barre N, Treignier M, Alonso JM, Mollaret HH. Biochemical, serological and phage typing characteristics of 459 *Yersinia* strains isolated from a terrestrial ecosystem. *Curr Microbiol.* 1978;1:353-7.
- Bercovier H, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Fanning GR, Carter GP, Mollard H. *Yersinia kristensenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of sucrose-negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). *Curr Microbiol.* 1980;4:219-24.
- Bercovier H, Steigerwalt AG, Guiyoule A, Huntley-Carter G, Brenner DJ. *Yersinia aldovae* (formerly *Yersinia enterocolitica*-like group X2): a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from aquatic ecosystem. *Int J Syst Bacteriol.* 1984;34:1166-72.
- Berres ME. An introduction to AFLP and fAFLP. 2002 (zitiert vom 03.06.2004)
<http://ravel.zoology.wisc.edu/sgaap/AFLP_html/fAFLP_Introduction.htm>
- Bhaduri S, Cottrell B. Direct detection and isolation of plasmid-bearing virulent serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various foods. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:4952-5.

- Bin-Kun H, De-Sheng X, Hong-Bi O, Zhang SX, Slee KJ. Yersiniosis in sheep due to *Yersinia enterocolitica*. Br Vet J. 1994;150:473-9.
- Black RE, Jackson RJ, Tsai T, Medvesky M, Shayegani M, Feeley JC, Macleod KI, Wakelee AM. Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. N Engl J Med. 1978;298:76-9.
- Blaser M, Cravens J, Powers BW, Wang WL. *Campylobacter* enteritis associated with canine infection. Lancet. 1978;II(8097):979-81.
- Bolton FJ, Hinchcliffe PM, Coates D, Robertson L. A most probable number method for estimating small numbers of campylobacters in water. J Hyg Camb. 1982;89:185-90.
- Bolton FJ, Hutchinson DN, Parker G. Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* spp. from feces. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1988;7:155-60.
- Bolton FJ, Robertson L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. J Clin Pathol. 1982;35:462-7.
- Bonardi S, Brindani F, Pizzin G, Lucidi L, D'Incau M, Liebana E, Morabito S. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. Int J Food Microbiol. 2003;85:101-10.
- Borck B, Nielsen EM, Pedersen K, Madsen M. Prevalence and serotypes of *Campylobacter* spp. in Danish turkeys. Int. J. Med. Microbiol. 2001; 291, Suppl. 31, 11th International workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms: 43.
- Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: The carisma continues. Clin Microbiol Rev. 1997;10:257-276.
- Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microbes Infect. 1999;1:323-33.
- Brenner DJ, Bercovier H, Ursing J, Alonso JM, Steigerwalt AG, Fanning GR, Carter GP, Mollaret HH. *Yersinia intermedia*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive, melbiose-positive, raffinose-positiv strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr Microbiol. 1980;4:207-12.

- Brenner DJ, Steigerwalt AG, Falxo DP, Weaver RE, Fanning GR. Characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by deoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reactions. Int J Syst Bacteriol. 1976;26:180-94.
- Browning GF, Chalmers RM, Snodgrass DR, Batt RM, Hart CA, Ormarod SE, Leadon D, Stoneham SJ, Rossdale PD. The prevalence of enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. Equine Vet J. 1991;23:405-9.
- Brüggemann M, Peters M, Mumme J. Fallbericht: *Yersinia enterocolitica*-Septikämie bei einem American Minipig. Dtsch tierärztl Wschr. 2001;108:257-60.
- Bucher M. Ein Beitrag zur Epidemiologie von *Yersinia enterocolitica* in Schlachtnebenprodukten vom Schwein unter besonderer Berücksichtigung methodischer Aspekte. [Dissertation med. vet]. München: Univ. München; 2001a.
- Bucher M, Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A. Praevalenz von *Yersinia spp.* in Kälbern und Bullen. Proceedings 42. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG. 25.09.-28.09.2001b; Garmisch-Partenkirchen, Deutschland: S. 442-4.
- Bush EJ, Wesley I, Bhaduri S. Risk factors for *Yersinia enterocolitica* on U.S. swine farms in 2000. Safe Pork - Proceedings of the 5th international symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork. 01.10.-04.10.2003; Kreta, Griechenland: pp. 54-6.
- Bülte M, Klein G, Reuter G. Schweineschlachtung- Kontamination des Fleisches durch menschenpathogene *Yersinia-enterocolitica*-Stämme? Fleischwirtsch. 1991;71(12):1411-6.
- Butzler JP, Dekeyser P, Detrain M, Dehaen F. Related *Vibrio* in stools. J Pediatr. 1973;82:493-5.
- Chan FTH, Stringel G, Mackenzie AMR. Isolation of *Campylobacter jejuni* from an appendix. J Clin Microbiol. 1983;18:422-4.
- Chang VP, Mills EW, Cutter CN. Reduction of bacteria on pork carcasses associated with chilling method. J Food Prot. 2003;66:1019-24.
- Chantarapanont W, Berrang M, Frank JF. Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin. J Food Prot. 2003;66:2222-30.

Cheng LW, Schneewind O. *Yersinia enterocolitica* type III Secretion: On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. J Biol Chem. 1999;274:22102-8.

Cheng LW, Schneewind O. *Yersinia enterocolitica* TyeA, an intracellular regulator of the type III machinery, is required for specific targeting of YopE, YopM, and YopN into the cytosol of eukaryotic cells. J Bacteriol. 2000;182:3183-90.

Christensen SG. The *Yersinia enterocolitica* situation in Denmark. Contr Microbiol Immunol. 1987;9:93-7.

Christensen H, Lüthje H. Reduced spread of pathogens as a result of changed pluck removal technique. Proc Int Cong Meat Sci Technol., The Hague, Holland; 1994: S-III.06

Zitiert nach: Nielsen B, Bager F, Mousing J, Dahl J, Halgaard C, Christensen H. Danish perspective on the implementation of HACCP in the swine industry. 75th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, IL; 1995: 11-20. (zitiert vom 11.06.2004)

<www.cvm.uiuc.edu/HACCP/Symposium/NIELSEN.HTM>

Cloak OM, Fratamico PM. A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistant profiles. J Food Prot. 2002;65:266-73.

Corbel MJ, Ellis B, Richardson C, Bradley R. Experimental *Yersinia enterocolitica* placentitis in sheep. Br Vet J. 1992;148:339-49.

Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1315-52.

Corry JEL, Atabay HI. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. J Appl Microbiol. 2001;90:96S-114S.

Corry JEL, Post DE, Colin P, Laisney MJ. Culture media for the isolation of campylobacters. Int J Food Microbiol. 1995;26:43-76.

Cover TL, Aber RC. *Yersinia enterocolitica*. New Engl J Med. 1989;321:16-24.

Cox NA, Bailey JS. Comparison of enrichment and plating media for isolation of *Yersinia*. Poultry Sci. 1990;69:686-93.

- Cox NA, Del Corral F, Bailey JS, Shotts EB, Papa CM. The presence of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species on the carcasses of market broilers. Poultry Sci. 1989;69:482-5.
- De Boer E. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods. Int J Food Microbiol. 1992;17:75-84.
- De Boer E, Hahné M. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. J Food Prot. 1990;53:1067-8.
- De Boer E, Humphrey TJ. Comparison of methods for the isolation of thermophilic campylobacters from chicken products. Microb Ecol Health Dis. 1991;4:S43
- De Boer E, Nouws JFM. Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Int J Food Microbiol. 1991;12:375-8.
- Dedie K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer K.-J, Weinke T. Yersiniosen mit enteritischem Verlauf beim Menschen. In: Lehrbuch über bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung. Stuttgart: Ferdinand Enke; 1993: S. 377-98.
- Dekeyser P, Gossuin-Detrain M, Butzler JP, Sternon J. Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. J Infect Dis. 1972;125:390-2.
- De Koning-Ward TF, Robins-Browne RM. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun. 1995;63:3790-5.
- De Koning-Ward TF, Ward AC, Robins-Browne RM. Characterisation of the urease-encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*. Gene. 1994;145:25-32.
- Delor I, Kaeckenbeeck A, Wauters G, Cornelis GR. Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. Infect Immun. 1990;58:2983-8.
- Deming MS, Tauxe RV, Blake PA, Dixon SE, Fowler BS, Jones TS, Lockamy EA, Patton CM, Sikes RO. *Campylobacter* enteritis at a University: transmission from eating chicken and from cats. Am J Epidemiol. 1987;126:526-34.

- Denis M, Refregier-Petton J, Laisney MJ, Ermel G, Salvat G. *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. J Appl Microbiol. 2001;91:55-267.
- De Rouvroit L, Sluiter C, Cornelis GR. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol. 1992;6:395-409.
- Devenish JA, Schiemann DA. An abbreviated scheme for identification of *Yersinia enterocolitica* isolated from food enrichment on CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin) agar. Can J Microbiol. 1981;27:937-41.
- Dickins MA, Franklin S, Stefanova R, Schutze GE, Eisenach KD, Wesley I, Cave MD. Diversity of *Campylobacter* isolates from retail poultry carcasses and from humans as demonstrated by pulsed-field gel electrophoresis. J Food Prot. 2002;65:957-62.
- Di Genaro MS, Escudero ME, Munoz E, Aguilera C, Scardapane L, De Guzman AM. Intranasal immunization with *Yersinia enterocolitica* O:8 cellular extract protects against local challenge infection. Microbiol Immunol. 1998;42:781-8.
- Dolby JM, Newell DG. The protection of infant mice from colonization with *Campylobacter jejuni* by vaccination of the dams. J Hyg. 1986;96:143-51.
- Doyle LP. A vibrio associated with swine dysentery. Am J Vet Res. 1944;5:3-5
- Doyle MP, Roman DJ. Recovery of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from inoculated foods by selective enrichment. Appl Environ Microbiol. 1982;43:1343-53.
- Dudley MV, Shotts EB. Medium for isolation of *Yersinia enterocolitica*. J Clin Microbiol. 1979;10:180-3.
- Duim B, Ang CW, Van Belkum A, Righer A, Van Leeuwen NW, Endtz HP, Wagenaar JA. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from chickens and from patients with gastroenteritis or Guillain-Barré or Miller Fisher syndrome. Appl Environ Microbiol. 2000;66:3917-23.
- Duim B, Vandamme PAR, Righer A, Laevens S, Dijkstra JR, Wagenaar JA. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. Microbiology. 2001;147:2729-37.

- Duim B, Wassenaar TM, Richter A, Wagenaar J. High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Appl Environ Microbiol. 1999;65:2369-75.
- Endtz HP, Vliegenthart JS, Vandamme P, Weverink HW, Van Der Braak NP, Verbrugh HA, Van Belkum A. Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in The Netherlands. Int. J Food Microbiol. 1997;34:79-88.
- Engberg J, Gerner-Schmidt P, Scheutz F, Moller Nielsen E, On SL, Molbak K. Water-borne *Campylobacter jejuni* infection in a Danish town – a 6-week continuous source outbreak. Clin Microbiol Infect. 1998;4:648-56.
- Engvall EO, Brandstrom B, Andersson L, Baverud V, Trowald-Wigh G, Englund L. Isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* species in faecal samples from Swedish dogs. Scand J Infect Dis. 2003;35:713-8.
- Erwerth W, Nattermann H. Histopathologische Untersuchungen bei der experimentellen oralen *Yersinia enterocolitica*-Infektion des Jungschweines. Mh Vet-Med. 1987;42:319-24.
- Escherich T. Beiträge zur Kenntnis der Darmbakterien. II. *Vibrio felinus*. Münch. Med. Wschr. 1886;33:759-63.
- Fallon RV, Doolan L, O'Sullivan NA, Smith T, Carroll CV. Isolation of *Campylobacter* species from farm to fork in Ireland. Int J Med Microbiol. 2001;291: Suppl. 31, 11th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms, 38.
- Farmer JJ, Carter GP, Miller VL, Falkow S, Wachsmuth IK. Pyrazinaminidase, CR-MOX agar, salicin fermentation, esculin hydrolysis, and d-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. J Clin Microbiol. 1992;30:2589-94.
- Fehlhaber K. *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*. In: Fehlhaber K, Janetschke P, Hrsg. Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene; Jena: Gustav Fischer; 1992: S. 65-7
- Feng P, Keasler SP, Hill WE. Direct identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by polymerase chain reaction. Transfusion. 1992;32:850-4.

Fenwick SG, Murray A. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction. Lancet. 1991;337(8739):496-7.

Fernandez H, Vergara M, Tapia F. Desiccation resistance in thermotolerant *Campylobacter* species. Infection. 1985;13:197.

Field LH, Headley VL, Payne SM, Berry LJ. Influence of iron on growth, morphology, outer membrane protein composition, and synthesis of siderophores in *Campylobacter jejuni*. Infect Immun. 1986;54:126-32.

Frediani-Wolf V, Stephan R. Resistance patterns of *Campylobacter* spp. strains isolated from poultry carcasses in a big Swiss poultry slaughterhouse. Int J Food Microbiol. 2003;89:233-40.

Fredriksen W. A study of some *Yersinia-pseudotuberculosis*-like bacteria („*Bacterium enterocoliticum*“ and *Pasteurella* X). Proceedings of the XIV Scandinavian Congress on Pathology and Microbiology, Oslo, Norwegian Universities Press. 1964: pp. 103-4.

Fredriksson-Ahomaa M, Autio T, Korkeala H. Efficient subtyping of *Yersinia enterocolitica* bioserovar 4/O:3 with pulsed-field gel electrophoresis. Lett Appl Microbiol. 1999b;29:308-12.

Fredriksson-Ahomaa M, Björkroth J, Hielm S, Korkeala H. Prevalence and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils from different slaughterhouses. Food Microbiol. 2000;17:93-101.

Fredriksson-Ahomaa M, Bucher M, Hank C, Stolle A, Korkeala H. High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in Southern Germany: a slaughtering technique problem. System Appl Microbiol. 2001a;24:457-63.

Fredriksson-Ahomaa M, Hielm S, Korkeala H. High prevalence of *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland. J Food Prot. 1999a;62:123-7.

Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. Clin Microbiol Rev. 2003;16:220-9.

Fredriksson-Ahomaa M, Korte T, Korkeala H. Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork. Lett Appl Microbiol. 2001b;32:375-8.

Fredriksson-Ahomaa M, Lyhs U, Korte T, Korkeala H. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food samples at retail level in Finland. Arch Lebensmittelhyg. 2001c;52:66-8.

- Fry BN, Korolik V, Ten Brinke JA, Pennings MT, Zalm R, Teunis BJ, Coloe PJ, Van Der Zeijst BA. The lipopolysaccharide biosynthesis locus of *Campylobacter jejuni* 81116. *Microbiology*. 1998;144:2049-61.
- Fukushima H. New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol*. 1987;25:1068-73.
- Fukushima H, Gomyoda M. Inhibition of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 by natural microflora of pork. *Appl Environ Microbiol*. 1986;51:990-4.
- Fukushima H, Hoshina K, Itogawa H, Gomyoda M. Introduction into Japan of pathogenic *Yersinia* through imported pork, beef and fowl. *Int J Food Microbiol*. 1997;35:205-12.
- Fukushima H, Maruyama K, Omori I, Ito K, Iorihara M. Bedeutung kontaminierter Schweinehaut für die Verunreinigung von Schweinetierkörpern mit fäkalen Yersinien bei der Schlachtung. *Fleischwirtsch*. 1989;69:409-13.
- Fukushima H, Maruyama K, Omori I, Ito K, Iorihara M. Kontamination von Schweinen mit *Yersinia* im Schlachthaus. *Fleischwirtsch*. 1990;70:1330-5.
- Fukushima H, Nakamura R, Ito Y, Saito K, Tsubokura M, Otsuki K. Ecological studies of *Yersinia enterocolitica*. I. Dissemination of *Y. enterocolitica* in pigs. *Vet Microbiol*. 1983;8:469-83.
- Funk JA, Troutt HF, Isaacson RE, Fossler CP. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in groups of swine at slaughter. *J Food Prot*. 1998;61:677-82.
- Garrity GM, Winters M, Searles DB. Taxonomic outline of the procaryotic genera. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer: New York; 2001: p. 161.
- Gaull F. Vorkommen thermophiler *Campylobacter* spp. bei Schweinen im Betrieb und auf dem Schlachthof, auf Putenschlachtetierkörpern und in Lebensmitteln tierischen Ursprungs – Typisierung der Isolate mit molekularbiologischen Fingerprintmethoden und Vergleich der Isolate untereinander und mit humanen Isolaten. [Dissertation med. vet]. Leipzig, Univ. Leipzig; 2002.

Gebreyes WA, Bahnson PB, Funk JA, Morgan Morrow WE, Thakur S. *Campylobacter* prevalence and diversity in antimicrobial free and conventionally reared market swine. Safe pork-Proceedings of the 5th international symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork. 01.10.-04.10.2003; Kreta, Griechenland: pp. 49-51.

Gilbert M, Karwaski MF, Bernatchez S, Young NM, Taboada E, Michniewicz J, Cunningham AM, Wakarchuk WW. The genetic bases for the variation in the lipo-oligosaccharide of the mucosal pathogen, *Campylobacter jejuni*. Biosynthesis of sialylated ganglioside mimics in the core oligosaccharide. J Biol Chem. 2002;277:327-37.

Gonzalez I, Grant KA, Richardson PT, Park SF, Collins MD. Specific identification of the enteropathogenes *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. J Clin Microbiol. 1997;35:759-63.

Goossens H, De Boeck M, Butzler JP. A new selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from human feces. Eur J Clin Microbiol. 1983;2:389-93.

Goossens H, Vlaes L, Galand I, Van Den Borre C, Butzler JP. Semisolid blood-free selective-motility-medium for the isolation of campylobacters from stool specimens. J Clin Microbiol. 1989;27:1077-80.

Görgen M, Kirpal G, Bisping W. Untersuchungen zum Vorkommen von Keimen der Gattung *Campylobacter* beim Schwein. Teil I: Kulturelle Untersuchungen von Kot, Darminhalt und Gallenblasen. Berl Münch Tierärztl Wschr. 1983;96:86-9.

Gripenberg-Lerche C, Zhang L, Ahtonen P, Toivanen P, Skurnik M. Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:8: role of urease in virulence and arthritogenicity. Infect Immun. 2000;68:942-7.

Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP, Cornelis GR. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. Infect Immun. 2002;70:4165-76.

Gun-Munro J, Rennie RP, Thornley JH, Richardson HL, Hodge D, Lynch J. Laboratory and clinical evaluation of isolation media for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 1987;25:2274-7.

Hadden RDM, Gregson NA. Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. J Appl Microbiol. 2001;90:145S-54S.

- Hänninen ML, Perko-Mäkelä P, Rautelin H, Duim B, Wagenaar JA. Genomic relatedness within five common Finish *Campylobacter jejuni* pulsed-field gel electrophoresis genotypes studied by amplified fragment length polymorphism analysis, ribotyping and serotyping. Appl Environ Microbiol. 2001;67:1581-6.
- Harmon MC, Yu CL, Swaminathan B. An evaluation of selective differential plating media for the isolation of *Yersinia enterocolitica* from experimentally inoculated fresh ground pork homogenate. J Food Sci. 1983;48:6-9.
- Harris LA, Logan SM, Guerry P, Trust TJ. Antigenetic variation of *Campylobacter* flagella. J Bacteriol. 1987;169:5066-71.
- Harvey S, Greenwood JR, Pickett MJ, Mah RA. Recovery of *Yersinia enterocolitica* from streams and lakes in California. Appl Environ Microbiol. 1976;32:352-4.
- Harvey RB, Young CR, Anderson RC, Droleskey RE, Genovese KJ, Egan LF, Nisbet DJ. Diminution of *Campylobacter* colonization in neonatal pigs reared off-sow. J Food Prot. 2000;63:1430-2.
- Head CB, Whitty DA, Ratnam S. Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*. J Clin Microbiol. 1982;16:615-21.
- Heesemann J. Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. In: Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G, Hrsg. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 7. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer; 1994: S. 425-36.
- Heesemann J, Gross U, Schmidt N, Laufs R. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. Infect Immun. 1986;54:561-7.
- Heuer OE, Pedersen K, Andersen JS, Madsen M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. Lett Appl Microbiol. 2001;33:269-74.
- Hillier AJ, Davidson BE. Pulsed field gel electrophoresis. Methods Mol Biol. 1995;46:149-64.
- Hoogkamp-Korstanje JA, De Koning J. Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia enterocolitica*-Infektionen. Immun Infekt. 1990;18:192-7.
- Hoogkamp-Korstanje JA, Stolk-Engelaar VM. *Yersinia enterocolitica* infection in children. Pediatr Infect Dis J. 1995;14:771-5.

Horman A, Rimhanen-Finne R, Maunula L, Von Bonsdorff CH, Torvela N, Heikinheimo A, Hanninen ML. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:87-95.

Hu L, Kopecko DJ. Interactions of *Campylobacter* with eukaryotic cells: gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2000: pp. 191-215.

Hu L, Kopecko DJ. *Campylobacter* species. In: Miliotis MD, Bier JW, editors. *International handbook of foodborne pathogens*. New York: Marcel Dekker; 2003: pp. 181-98.

Hugdahl MB, Beery JT, Doyle MP. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 1988;56:1560-6.

Hunt JM, Abeyta C, Tran T. Isolation of *Campylobacter* species from food and water. In: *Food and Drug Administration bacteriological analytical manual*. 8th ed. Gaithersburg: AOAC International; 1998: pp. 701-24.

Hutchinson DN, Bolton FJ. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J Clin Pathol.* 1984;37:956-7.

Huysmans MB, Turnidge JD, Williams JH. Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic campylobacters. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3345-6.

Ibrahim A, Liesack W, Stachebrandt E. Polymerase chain reaction gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1942-7.

Idogawa H, Imamur A, Matsuo K, Yoshitae K, Umemura T, Ohashi M. A monoarthritis model in rabbits induced by repeated intra-articular injections of lipopolysaccharide. *Int J Exp Pathol.* 1998;79:99-104.

Iseberg RR, Falkow S. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature.* 1985;317:262-4.

Iseberg RR, Leong JM. Multiple B1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 1990;60:861-71.

- Izard D, Husson MO, Vincent P, Leclerc H, Monget D, Boeufgras M. Evaluation of the four-hour Rapid 20E system for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 1984;20:51-4.
- Jacobs-Reitsma WF, Van De Giessen AW, Bolder NM, Mulder RWA. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. Epidemiol Infect. 1995;114:413-21.
- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology. 1996;142:1881-9.
- Jansson PE, Lindberg AA, Wolling R. Structural studies on the hexose region of core lipopolysaccharide from *Enterobacteriaceae*. Eur J Biochem. 1981;115:571-7.
- Jayarao BM, Henning DR. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. J Dairy Sci. 2001;84:2157-62.
- Jeffrey JS. Use of competitive exclusion products for poultry. Poultry Fact Sheet No 30, 1999; University of California. (zitiert vom 29.05.2004) <<http://animalscience.ucdavis.edu/Avian/pfs30.htm>>
- Jentzen A, Hellmann E. Zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Faecesproben des Hundes. Fortschr Vet Med. 1980;30:216-23.
- Jones K. *Campylobacters* in water, sewage and the environment. J Appl Microbiol. 2001;90:68S-79S.
- Jones K, Howard S, Wallace JS. Intermittent shedding of thermophilic campylobacters by sheep at pasture. J Appl Microbiol. 1999;86:531-6.
- Jones FS, Orcutt M, Little RB. Vibrios (*Vibrio jejuni*, n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. J Exp Med. 1931;53:853-64.
- Kapperud G, Vardund T, Skjerve E, Hornes E, Michaelsen TE. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reaction, and colorimetric detection of amplified DNA. Appl Environ Microbiol. 1993;59:2938-44.
- Karib H, Seeger H. Vorkommen von Yersinien- und *Campylobacter*-Arten in Lebensmitteln. Fleischwirtsch. 1994;74(10):1104-6.
- Karmali MA, Fleming PC. *Campylobacter* enteritis. Can Med Assoc J. 1979;120:1525-32.

- Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. J Clin Microbiol. 1986;23:456-9.
- Katayama Y, Kuwano A, Yoshihara T. Histoplasmosis in the lung of a race horse with yersiniosis. J Vet Med Sci. 2001;63:1229-31.
- Khalafalla FA. *Yersinia enterocolitica* bei verarbeitetem Geflügel. Fleischwirtsch. 1990;70(3):351-2.
- King EO. Human infections with *Vibrio fetus* and closely related *Vibrio*. J Infect Dis. 1957;101:119-28.
- King EO. The laboratory recognition of *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio* isolated from cases of human vibriosis. Ann NY Acad Sci. 1962;98:700-11.
- Kist M. Die Gattungen *Streptobacillus*, *Campylobacter* und *Helicobacter*. In: Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G, Hrsg. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 7. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer; 1994: S. 489-95.
- Kist M. Lebensmittelbedingte Infektionen durch *Campylobacter*. Bundesgesundheitsbl. 2002;45:497-506.
- Kleemann J, Bergann T. *Yersinia* spp. in frischer Rohwurst- Untersuchungen zum Vorkommen und zur Charakterisierung der *Yersinia enterocolitica*-Isolate. Fleischwirtsch. 1994;74(10):1101-3.
- Klemm C, Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A. Vereinfachtes PFGE-Protokoll für Salmonellen und Yersinien. Proceedings 44. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG. 29.09.-02.10.2003; Garmisch-Partenkirchen, Deutschland (im Druck).
- Kokotovic B, On SL. High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. FEMS Microbiol Lett. 1999;173:77-84.
- Konkel ME, Hayes SF, Joens LA, Cieplak W Jr. Characteristics of the internalization and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human epithelial cell cultures. Microb Pathog. 1992;13:357-70.
- Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V, Garvis SG. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. Mol Microbiol. 1999;32:691-701.

- Kontny I, Steffen W. Isolierung von *Yersinia enterocolitica* aus Stuhl- und Lebensmittelproben nach Kälteanreicherung. Z Klin Med. 1989;44:1883-6.
- Kopecko DJ, Hu L, Zaal KJM. *Campylobacter jejuni*- microtubule-dependent invasion. Trends Microbiol. 2001;9:389-96.
- Korte T, Fredriksson-Ahomaa M, Niskanen T, Korkeala H. Low prevalence of *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in Sows. Foodborne Pathogens and Disease. 2004;1:45-52.
- Kramer JM, Frost JA, Bolton FJ, Wareing DR. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. J Food Prot. 2000;63:1654-9.
- Kwaga J, Iversen JO, Misra V. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled polynucleotide probes. Clin Microbiol. 1992;30:2668-73.
- Kwiatek K, Wojton B, Stern NJ. Prevalence and distribution of *Campylobacter* spp. on poultry and selected red meat carcasses in Poland. J Food Prot. 1990;53:127-30.
- Ledergerber U, Regula G, Danuser J, Bissig-Choisat B, Jemmi T, Stärk KDC. Prävalenz latenter Zoonoseerreger in tierfreundlicher Schweineproduktion. Arch Lebensmittelhyg. 2003;54:90-6.
- Lee WH, Harris ME, McClain D, Smith RE, Johnston RW. Two modified selenite media for therecovery of *Yersinia enterocolitica* from meats. Appl Environ Microbiol. 1980;39:205-9.
- Lee A, O'Rourke JL, Barrington PJ, Trust TJ. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. Infect Immun. 1986;51:536-46.
- Letellier A, Messier S, Quessy S. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. J Food Prot. 1999;62:22-5.
- Li H, Bhaduri S, Magee WE. Maximizing plasmid stability and production of released proteins in *Yersinia enterocolitica*. Appl Environ Microbiol. 1998;64:1812-5.
- Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Melby KK, Kapperud G. Comparative fingerprinting analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains by amplified-fragment length polymorphism genotyping. J Clin Microbiol. 2000;38:3379-87.

- Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrhoeic samples. J Clin Microbiol. 1997;35:2568-72.
- Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J Clin Microbiol. 1982;15:761-8.
- Loewenherz K. Untersuchungen zum Vorkommen von *Campylobacter jejuni* in verschiedenen Lebensmitteln tierischen Ursprungs. [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 1995.
- Logue CM, Sherwood JS, Elijah LM, Olah PA, Dockter MR. The incidence of *Campylobacter* spp. on processed turkey from processing plants in the midwestern United States. J Appl Microbiol. 2003;95:234-41.
- Lötsch G. Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* bei Speisefischen und ausgewählten Fischprodukten. Mh Vet-Med. 1986;41:496-8.
- Ludes A, Weiss R. Zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* beim Schaf. Berl Münch Tierärztl Wschr. 1984;97:198-202.
- Madden RH, Moran L, Scates P. Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower gastrointestinal tract. J Microbiol Methods. 2000;42:115-9.
- Marchant J, Wren B, Ketley J. Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. Trends Microbiol. 2002;10:155-9.
- Marshall SM, Melito PL, Woodward DL, Johnson WM, Rodgers FG, Mulvey MR. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol. 1999;37:4158-60.
- Martin WT, Patton CW, Morris GK, Potter ME, Puhf ND. Selective enrichment broth for isolation of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 1983;17:853-5.
- Maurer AM, Sturchler D. A waterborne outbreak of a small round structured virus, *Campylobacter* and *Shigella* coinfection in La Neuveville, Switzerland, 1998. Epidemiol Infect. 2000;125:325-32.

- McFadyean J, Stockman S. Report of the departmental committee appointed by the board of agriculture and fisheries to inquire into epizootic abortion, III. Abortion in sheep. His Majesty's Stationary Office (HMSO), London, United Kingdom. 1913:1-64.
- McIver MA, Pike URM. Chronic glanders-like infection of face caused by an organism resembling *Flavobacterium pseudomallei* Whitmore. Clinical miscellany. 1934;1:16-21.
- McSweegan E, Walker RI. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. Infect Immun. 1986;53:141-8.
- Megraud F, Tachoire C, Latrille J, Bondonny JM. Appendicitis due to *Campylobacter jejuni*. Br Med J. 1982;285:1165-6.
- Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G. Secretion of Yop proteins by Yersiniae. Infect Immun. 1990;58:2840-9.
- Mikulskis AV, Delor I, Thi VH, Cornelis GR. Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin *yst* gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. Mol Microbiol. 1994;14:905-15.
- Miller IS, Bolton FJ, Dawkins HC. An outbreak of *Campylobacter* enteritis transmitted by puppies. Environ Health. 1987;95:11-14.
- Miller VL, Falkow S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. Immun. 1988;56:1242-8.
- Miller VL, Farmer 3rd JJ, Hill WE, Falkow S. The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotyps commonly associated with disease. Infect Immun. 1989;57:121-31.
- Mollaret H, Bercovier H, Alonso J. Summary of the data received at the Reference Center for *Yersinia enterocolitica*. Contr Microbiol Immunol. 1979;5:174-84.
- Mrass PE, Gattringer R, Graninger W, Georgopoulos A. Pulsfeld-Gel-Elektrophorese, molekulare Analyse zur Typisierung von Mikroorganismen. 2004 (zitiert vom 07.06.2004)
<http://www.ahc-net.at/0001/antibiotika_monitor/56_00/56_00_7.htm>

- Nachamkin I, Allos BM, Ho TW. *Campylobacter jejuni* infection and the association with Guillain-Barré Syndrome. In: Nachamkin I. Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2000a: pp. 155-75.
- Nachamkin I, Engberg J, Moller Aarestrup F. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species. In: Nachamkin I. Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2000b: pp. 45-66.
- Nadeau E, Messier S, Quessy S. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. J Food Prot. 2002;65:73-8.
- Najdenski H, Iteman I, Carniel E. Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1994;32:2913-20.
- Najdenski H, Iteman I, Carniel E. The genome of *Yersinia enterocolitica* is the most stable of the three pathogenic species. Contrib Microbiol Immunol. 1995;13:281-4.
- Nattermann H. Untersuchungen zur Diagnostik, Epizootiologie, Pathogenese und Klinik der *Yersinia enterocolitica*-Infektion bei Schweinen, Rindern, Hühnern und Hunden. [Dissertation med. vet]. Berlin: Humboldt-Univ. Berlin; 1986a.
- Nattermann H, Horsch F, Dee W, Ortmann G. Die *Yersinia-enterocolitica*-Infektion bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Mh Vet-Med. 1986b;41:23-6.
- Nattermann H, Horsch F, Schlingmann H. Orientierende Untersuchungen zur Immunprophylaxe der *Yersinia-enterocolitica*-Infektion des Schweines. Mh Vet-Med. 1990;45:709-13.
- Nattermann H, Horsch F, Seeger M, Dee W, Schlingmann C, Schlingmann H. Epizootiologie der *Yersinia-enterocolitica*-Infektion in einem Schweinebestand. Mh Vet-Med. 1985;40:366-70.
- Neilson AH. Isolation and characterization of bacteria from the Baltic Sea. J Appl Bact. 1980;49:199-213.
- Nesbakken T. Enumeration of *Yersinia enterocolitica* O:3 from the porcine oral cavity, and its occurrence on cut surfaces of pig carcasses and the environment in a slaughterhouse. Int J Food Microbiol. 1988;6:287-93.

- Nesbakken T, Eckner K, Hoidal HK, Rotterud OJ. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. Int J Food Microbiol. 2002;80:231-40.
- Nesbakken T, Nerbrink E, Rotterud OJ, Borch E. Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp. on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter. Int J Food Microbiol. 1994;23:197-208.
- Nesbakken T, Skjerve E. Interruption of microbial cycles in farm animals from farm to table. Meat Sci. 1996;43:S47- S57.
- Neubauer H, Aleksic S, Hensel A, Finke EJ, Meyer H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but from three homology groups. Int J Med Microbiol. 2000a;290:61-4.
- Neubauer H, Sauer T, Becker H, Aleksic S, Meyer H. Comparison of systems for identification and differentiation of species within the genus *Yersinia*. J Clin Microbiol. 1998;36:3366-8.
- Neubauer H, Sprague LD, Scholz H, Hensel A. *Yersinia enterocolitica*-Infektionen: 1. Bedeutung bei Tieren. Berl Münch Tierärztl Wschr. 2001a;114:8-12.
- Neubauer H, Sprague LD, Scholz H, Hensel A. *Yersinia enterocolitica*-Infektionen: 2. Bedeutung beim Menschen. Berl Münch Tierärztl Wschr. 2001b;114:81-7.
- Newell DG, Frost JA, Duim B, Wagenaar JA, Madden RH, Van Der Plas J, On SLW. New developments in the subtyping of *Campylobacter* species. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2000: pp. 27-44.
- Newell DG, McBride H, Dolby JM. Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. J Hygiene. 1985;95:217-27.
- Newell DG, Wagenaar JA. Poultry infection and their control at the farm level. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. ASM Press, Washington D.C. 2000: pp. 497-509.
- Nielsen B, Heisel C, Wingstrand A. Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O:3 in experimentally infected pigs. Vet Microbiol. 1996;48:293-303

- Niléhn B. Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. Acta Path Microbiol Scand, Suppl. 1969a; 206:5
- Niléhn B. Studies on *Yersinia enterocolitica*: Growth on various solid media at 37°C and 25°C. Acta Path Microbiol Scand. 1969b;77:685-97.
- Noll A, Autenrieth IB. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. Infect Immun. 1996;64:2955-61.
- Noor SM, Husband AJ, Widders PR. In ovo oral vaccination with *Campylobacter jejuni* establishes early development of intestinal immunity in chickens. Br Poult Sci. 1995;36:563-73.
- Noyori K, Oamoto R, Taagi T, Hyodo A, Suzui K, Koshino T. Experimental induction of arthritis in rats immunized *Escherichia coli* O:14 lipopolysaccharide. J Rheumatol. 1994;21:484-8.
- Oberhelman RA, Taylor DN. *Campylobacter* infections in developing countries. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2000: pp. 139-53.
- On SL. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. J Appl Microbiol. 2001;90:1S-15S.
- Ono K, Yamamoto K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. Int J Food Microbiol. 1999;47:211-9.
- Ostroff SM, Kapperud G, Hutwagner LC, Nesbakken T, Bean NH, Lassen J, Tauxe RV. Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infections in Norway: a prospective case-control study. Epidemiol Infect. 1994;112:133-41.
- Otterness IG, Bliven ML, Milici AJ, Poole AR. Comparison of motility changes with histological and biochemical changes during lipopolysaccharide-induced arthritis in the hamster. Am J Pathol. 1994;144:1098-108.
- Overman TL, Plumley D, Overman SB, Goodman NL. Comparison of the API Rapid E four-hour system with the API 20E overnight system for the identification of routine clinical isolates of the family *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 1985;21:542-5.

- Oyofa BA, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR, Guerry P. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992;30:2613-9.
- Paerregaard A, Espersen F, Skurnik M. Role of the *Yersinia* outer membrane protein YadA in adhesion to rabbit intestinal tissue and rabbit intestinal brush border membrane vesicles. APMIS. 1991;99:226-32.
- Pai CH, Sorger S, Lafleur L, Lackmann L, Marks MI. Efficacy of cold enrichment techniques for recovery of *Yersinia enterocolitica* from human stools. J Clin Microbiol. 1979;9:712-5.
- Park SF. The physiology of *Campylobacter* spp. and its relevance to their role as foodborne pathogens. Int J Food Microbiol. 2002;74:177-88.
- Park CE, Stankiewicz ZK, Lovett J, Hunt J. Incidence of *Campylobacter jejuni* in fresh eviscerated whole market chickens. Can J Microbiol. 1981;27:841-2.
- Pearce RA, Wallace FM, Call JE, Dudley RL, Oser A, Yoder L, Sheridan JJ, Luchansky JB. Prevalence of *Campylobacter* within a swine slaughter and processing facility. J Food Prot. 2003;66:1550-6.
- Pearson AD, Greenwood MH, Donaldson J, Healing TD, Jones DM, Shahamat M, Feltham RK, Colwell RR. Continuous source outbreak of campylobacteriosis traced to chicken. J Food Prot. 2000;63:309-14.
- Pederson KJ, Carlson S, Pierson DE. The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol. 1997;26:99-107.
- Pederson KJ, Pierson DE. Ail expression in *Yersinia enterocolitica* is affected by oxygen tension. Infect Immun. 1995;63:4199-201.
- Penn CW. Surface components of *Campylobacter* and *Helicobacter*. J Appl Microbiol. 2001;90:25S-35S.
- Penner JL, Hennessy JN. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. J Clin Microbiol. 1980;12:732-7.
- Pepe JC, Miller JV. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:6473-7.

Petersen L, Nielsen EM, Engberg J, On SLW, Dietz HH. Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. Appl Environ Microbiol. 2001;67:3115-21.

Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M, Perin R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. Int J Food Microbiol. 2003;82:281-7.

Pickett CL. *Campylobacter* toxins and their role in pathogenesis. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2000: pp. 179-90.

Pierson DE, Falkow S. Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. Infect Immun. 1990;58:1059-64.

Pierson DE, Falkow S. The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. Infect Immun. 1993;61:1846-52.

Pilon J, Higgins R, Quessy S. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* in swine herds in Quebec. Can Vet J. 2000;41:383-87.

Pilz D, Vocke T, Heesemann J, Brade V. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. Infect Immun. 1992;60:189-95.

Portnoy DA, Moseley SL, Falkow S. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infect Immun. 1981;31:775-82.

Portnoy DA, Martinez RJ. Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. Curr Top Microbiol Immunol. 1985;118:29-51.

Preston MA, Penner JL. Characterization of cross-reacting serotypes of *Campylobacter jejuni*. Can J Microbiol. 1989;35:265-73.

Pullela S, Fernandes CF, Flick GJ, Libey GS, Smith SA, Coale CW. Indicative and pathogenic microbiological quality of aquacultured finfish grown in different production systems. J Food Prot. 1998;61:205-10.

- Radziejewska-Lebrecht J, Shashkov AS, Stroobant V, Wartenberg K, Warth C, Mayer H. The inner core region of *Yersinia enterocolitica* Ye75R (O:3) lipopolysaccharide. *Eur J Biochem.* 1994;221:343-51.
- Rasmussen HN, Rasmussen OF, Christensen H, Olsen JE. Detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in faecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. *J Appl Bacteriol.* 1995;78:563-68.
- Rautelin H, Jusufovic J, Hänninen ML. Identification of hippurate-negative thermophilic campylobacters. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999;35:9-12.
- Rea MC, Cogan TM, Tobin S. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J Appl Bacteriol.* 1992;73:331- 6.
- Reina J, Ros MJ, Serra A. Evaluation of the API Campy system in the biochemical identification of hippurate-negative *Campylobacter* strains from faeces. *J Clin Pathol.* 1995;48:683-5.
- Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett BJ. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1889-94.
- Rice BE, Rollins DM, Mallinson ET, Carr L, Joseph SW. *Campylobacter jejuni* in broiler chickens: colonization and humoral immunity following oral vaccination and experimental infection. *Vaccine.* 1997;15:1922-32.
- Riley G, Toma S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using Congo Red- Magnesium Oxalate Agar Medium. *J Clin Microbiol.* 1989;27:213-4.
- Riot B, Berche P, Simonet M. Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infect Immun.* 1997;65:1985-90.
- Robins-Browne RM, Hartland EL. *Yersinia* species. In: Miliotis MD, Bier JW, editors. International handbook of foodborne pathogens. New York: Marcel Dekker; 2003: pp. 323-55.
- Robins-Browne RM, Tzipori S, Gonis G, Hayes J, Withers M, Prpic JK. The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets. *J Med Microbiol.* 1985;19:297-308.
- Robinson DA, Edgar WJ, Gibson GL, Matchatt AA, Robertson L. *Campylobacter* enteritis associated with the consumption of unpasteurised milk. *Br Med J.* 1979;1:1171-3.

- Robinson DA, Jones DM. Milk-borne *Campylobacter* infection. Br Med J (Clin Res Ed). 1981;282:1374-6.
- Rogol M, Shpak B, Rothman D, Sechter I. Enrichment medium for isolation of *Campylobacter jejuni*-*Campylobacter coli*. Appl Environ Microbiol. 1985;50:125-6.
- Rohrbach BW, Draughon FA, Davidson PM, Oliver SP. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. J Food Prot. 1992;55:93-7.
- Rosef O. Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from the gallbladder of normal slaughter pigs, using an enrichment procedure. Acta vet Scand. 1981;22:149-51.
- Rosef O, Gondrosen B, Kapperud G, Underdal B. Isolation and characterisation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild animals in Norway. Appl Environ Microbiol. 1983;46:855-9.
- Rosef O, Rettedal G, Lageide L. Thermophilic campylobacters in surface water: a potential risk of Campylobacteriosis. Int J Environ Health Res. 2001;11:321-7.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. Infect Immun. 1996;64:724-33.
- Samadi AR, Wachsmuth K, Huq MI, Mahbub M, Agbonlahor DE. An attempt to detect *Yersinia enterocolitica* infection in Dacca, Bangladesh. Trop Geogr Med. 1982;34:151-4.
- Sauer T. Zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Rohmilch. [Dissertation med. vet]. München: Univ. München; 1996.
- Savelkoul PHM, Aarts HJM, De Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Osten M, Rademaker JLW, Schouls L, Lenstra JA. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clin Microbiol. 1999;37:3083-91.
- Scates P, Moran L, Madden RH. Effect of incubation temperature on isolation of *Campylobacter jejuni* genotypes from foodstuffs enriched in Preston broth. Appl Environ Microbiol. 2003;69:4658-61.
- Scheirle U. Zum Vorkommen von *Campylobacter* und Salmonellen in Rohmilch. [Dissertation med. vet]. München: Univ. München; 1988.

- Schiemann DA. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from surface and well water in Ontario. Can J Microbiol. 1978;24:1048-52.
- Schiemann DA. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. Can J Microbiol. 1979;25:1298-304.
- Schiemann DA. Isolation of toxogenic *Yersinia enterocolitica* from retail pork products. J Food Prot. 1980;43:360-5.
- Schiemann DA. Development of a two-step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from food. Appl Environ Microbiol. 1982;43:14-27.
- Schiemann DA. *Yersinia enterocolitica* in milk and dairy products. J Dairy Sci. 1987;70:383-91.
- Schiemann DA. The pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for piglets. Can J Vet Res. 1988;52:325-30.
- Schiemann DA. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: Doyle MP, editor. Foodborne Bacterial Pathogens. New York: Marcel Dekker; 1989: pp. 601-72.
- Schleifstein J, Coleman MB. An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis* and pathogenic for man. NY State J Med. 1939;39:1749-53
- Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by Pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 1984;37:67-75.
- Sebald M, Veron M. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. Ann Inst Pasteur. 1963;105:897-910.
- Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. Br Med J. 1977;2:9-11.
- Skirrow MB, Blaser MJ. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2000: pp. 69-88.
- Skirrow MB, Turnbull GL, Walker RE, Young SEJ. *Campylobacter jejuni* enteritis transmitted from cat to man. Lancet. 1980;I(8179):1188.

- Skjerve E, Lium B, Nielsen B, Nesbakken T. Control of *Yersinia enterocolitica* in pigs at herd level. Int J Food Microbiol. 1998;45:195-203.
- Skurnik M, Bolin I, Heikkinen H, Piha S, Wolf-Watz H. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. J Bacteriol. 1984;158:1033-6.
- Skurnik M, El Tahir Y, Saarinen M, Jalkanen S, Toivanen P. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. Infect Immun. 1994;62:1252-61.
- Skurnik M, Venho R, Bengoechea JA, Moriyon I. The lipopolysaccharid outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. Mol Microbiol. 1999;31:1443-62.
- Slee KJ, Button C. Enteritis in sheep and goats due to *Yersinia enterocolitica* infection. Aust Vet J. 1990;67:396-8.
- Slee KJ, Skilbeck NW. Epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections in sheep in Australia. J Clin Microbiol. 1992;30:712-5.
- Smith T, Taylor MS. Some morphological and biochemical characters of the spirella (*Vibrio fetus* n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. J Exp Med. 1919;30:299-312.
- Soltész L, Schalen C, Mardh PA. An effective, selective medium for *Yersinia enterocolitica* containing sodium oxalate. Acta Path Microbiol Scand Sect B. 1980;88:11-6.
- Stanley KN, Wallace JS, Currie JE, Diggle PJ, Jones K. The seasonal variation of thermophilic campylobacters in beef cattle, dairy cattle, and calves. J Appl Microbiol. 1998a;85:472-80.
- Stanley KN, Wallace JS, Currie JE, Diggle PJ, Jones K. Seasonal variation of thermophilic campylobacters in lambs at slaughter. J Appl Microbiol. 1998b;84:1111-6.
- Steele ML, McNab WB, Poppe C, Griffiths MW, Chen S, Dedrandis SA, Fruhner LC, Larkin CA, Lynch JA, Odumeru JA. Survey of Ontario bulk tank raw milk for foodborne pathogens. J Food Prot. 1997;60:1341-6.
- Steinhausserova I, Češková J, Fojtiková K, Obrovská I. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. J Appl Microbiol. 2001;90:470-5.

Steinhauserova I, Fojtikova K, Klimes J. The incidence and PCR detection of *Campylobacter upsaliensis* in dogs and cats. Lett Appl Microbiol. 2000;31:209-12.

Stengel G. Zur Diagnostik und Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Wasser. Zentralbl Veterinärmed B. 1986;33:82-92.

Sticht-Groh V. *Campylobacter* in healthy slaughter pigs: a possible source of infection for man. Vet Rec. 1982;110:104-6.

Stiller C. Zum Vorkommen von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Rohmilch von Erzeugerbetrieben in Nordbayern mit Versuchen zur Überlebensfähigkeit von *Campylobacter jejuni* in Milch. [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 1998.

Szita J, Kali M, Redey B. Incidence of *Yersinia enterocolitica* infection in Hungary. Contrib Microbiol Immunol. 1973;2:106-10.

Tacket CO, Narain JP, Sattin R, Lofgren JP, Konigsberg Jr C, Rendtorff RC, Rausa A, Davis BR, Cohen ML. A multistate outbreak of infections caused by *Yersinia enterocolitica* transmitted by pasteurized milk. JAMA. 1984;251:483-86.

Takata T, Fujimoto S, Amako K. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. Infect Immun. 1992;60:3596-600.

Tam CC, O'Brien SJ, Adak GK, Meakins SM, Frost JA. *Campylobacter coli*-an important foodborne pathogen. J Infect. 2003;47:28-32.

Tauxe RV, Vandepitte J, Wauters G, Martin SM, Gossens V, De Mol P, Van Noyen R, Thiers G. *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. Lancet. 1987;I(8542):1129-32.

Thibodeau V, Frost EH, Chenier S, Quessy S. Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally-inoculated pigs and the tonsils and feces of pigs at slaughter. Can J Vet Res. 1999;63:96-100.

Tholozan JL, Cappellet JM, Tissier JP, Delattre G, Federighi M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. Appl Environ Microbiol. 1999;65:1110-6.

Thurm V, Dinger E. Rohmilch in der Gemeinschaftsverpflegung als Infektionsquelle eines *Campylobacter jejuni*-Ausbruchs in Niedersachsen. Jahresbericht des BgVV, 1996: S. 120-1.

- Thurm V, Dinger E, Lyytikäinen O, Petersen L, Wiebelitz A, Lange D, Fischer R, Oppermann H, Mäde D. Infektionsepidemiologie lebensmittelbedingter *Campylobacter*-Infektionen. Bundesgesundheitsbl. 1999;42:206-11.
- Thurm V, Stark R, Mäde D, Fanghähnel S, Berger W, Knobloch H, Lange D. Rohmilch als Ursache lebensmittelbedingter *Campylobacter*-Infektionen. Bundesgesundheitsbl. 2000;43:777-80.
- Tokumaru M, Konuma H, Umesako M, Konno S, Shinagawa K. Rates of detection of *Salmonella* and *Campylobacter* in meats in response to the sample size and the infection level of each species. Int J Food Microbiol. 1991;13:41-6.
- Torre E, Tello M. Factors influencing fecal shedding of *Campylobacter jejuni* in dogs without diarrhea. Am J Vet Res. 1993;54:260-2.
- Ursing J, Brenner DJ, Bercovier HJ, Fanning GR, Steigerwalt AG, Alonso JM, Mollaret HH. *Yersinia frederiksenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr Microbiol. 1980;4:213-8.
- Ursinitsch B, Bless P, Köfer J. Prevalence and resistance behaviour of *Campylobacter* spp. in fecal and product samples of Styrian broiler flocks. Int J Med Microbiol. Suppl. 31, 11th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. 2001;291:40-1.
- Van Doorn LJ, Giesendorf BAJ, Bax R, van der Zeijst BAM, Vandamme P, Quint WGV. Molecular discrimination between *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by PCR based on a novel putative GTPase gene. Mol Cell Probes. 1997;11:177-85.
- Vanniasinkam T, Lanser JA, Barton MD. PCR for the detection of *Campylobacter* spp. in clinical specimens. Lett Appl Microbiol. 1999;28:52-6.
- Van Noyen R, Peeters P, Van Dessel F, Vandepitte J. Mycotic Aneurysm of the aorta due to *Yersinia enterocolitica*. Contr Microbiol Immunol. 1987a;9:122-6.
- Van Noyen R, Selderslaghs R, Bekaert J, Wauters G, Vandepitte J. Causative role of *Yersinia* and other enteric pathogens in the appendicular syndrome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991;10:735-41.

- Van Noyen R, Selderslaghs R, Wauters G, Vandepitte J. Optimal recovery of *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 from stools of patients with intestinal disorders. *Contr Microbiol Immunol*. 1987b;9:272-8.
- Van Vliet AHM, Ketley JM. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *J Appl Microbiol*. 2001;90:45S-56S.
- Velazquez LDC, Escudero ME, De Guzmán AMS. Biovars, serovars, and phagovars of *Yersinia enterocolitica* isolated from 450 samples of cold food in San Luis, Argentina. *J Food Prot*. 1993;56:333-5.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1995;23:4407-14.
- Wachtel MR, Miller VL. In vitro and in vivo characterization of an *ail* mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*. 1995;63:2541-8.
- Wassenaar TM. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol. Rev*. 1997;10:466-76
- Wauters G. Contribution à l'étude de *Yersinia enterocolitica*. Thèse d'agregé. Université Catholique de Louvain, 1970;Vander, Louvain, Belgium.
- Wauters G. Improved methods for the isolation and and recognition of *Yersinia enterocolitica*. *Contr Microbiol Immunol*. 1973;2:68-70.
- Wauters G, Aleksic S, Charlier J, Schulze G. Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. *Contr Microbiol Immunol*. 1991;12:239-43.
- Wauters G, Goossens V, Janssens M, Vandepitte J. New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork. *Appl Environ Microbiol*. 1988b;54:851-4.
- Wauters G, Janssens M, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Y. mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. *Int J Syst Bacteriol*. 1988a;38:424-9.
- Wauters G, Kandolo K, Janssens M. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol*. 1987;9:14-21.
- Weber A, Lembke C. Untersuchungen zum Vorkommen von humanpathogenen *Yersinia enterocolitica* bei Katzen. *Berl Münch Tierärztl Wschr*. 1981;94:325-7.

- Weber A, Lembke C, Schäfer R. Vergleichende Anwendung von zwei im Handel erhältlichen Selektivnährböden zur Isolierung von *Yersinia enterocolitica* aus Tonsillen von Schlachtschweinen. Zbl Vet Med B. 1983;30:532-6.
- Weijtens M. *Campylobacter* in pigs. [Dissertation med. vet]. Utrecht: Univ. Utrecht; 1996.
- Weijtens MJB, Bijker PG, Van Der Plas J, Urlings HA, Biesheuvel MH. Prevalence of *Campylobacter* in pigs during fattening; an epidemiological study. Vet Q. 1993;15:138-43.
- Weijtens MJB, Reinders RD, Urlings HAP, Van Der Plas J. *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. J Appl Microbiol. 1999;86:63-70.
- Weijtens MJB, Urlings HAP, Van Der Plas J, Bijker PGH, Kreuzkamp DA, Koster DS, Van Logtestijen JG. Establishing a *Campylobacter*-free pig population through a top-down approach. Lett Appl Microbiol. 2000;30:479-84.
- Weijtens MJB, Van Der Plas J, Bijker PGH, Urlings HAP, Franken P, Koster D, Van Logtestijen JG. The transmission of *Campylobacter* in piggeries; an epidemiological study. J Appl Microbiol. 1997;83:693-8.
- Weynants V, Tibor A, Denoel PA, Saegerman C, Godfroid J, Thiange P, Letesson JJ. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. Vet Microbiol. 1996;48:101-12.
- Wilson IG, Moore JE. Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. Epidemiol Infect. 1996;116:147-53.
- Wolfs TF, Duim B, Geelen SPM, Rigter A, Thomson-Carter F, FLeer A, Wagenaar JA. Neonatal sepsis by *Campylobacter jejuni*: Genetically proven transmission from a household puppy. Clin Infect Dis. 2001;32:E97-E99.
- Wuorela M, Jalamem S, Toivanen P, Granfors K. *Yersinia* lipopolysaccharide is modified by human monocytes. Infect Immun. 1999;61:5261-70.
- Wuthe HH, Aleksic S. *Yersinia enterocolitica* Serovar 1,2a,3 Biovar 3 in Chinchillas. Zbl Bakt. 1992;277:403-5.

Wuthe HH, Aleksic S. *Yersinia enterocolitica* Serovar 2a,2b,3b,c Biovar 5 bei Infektionen von Feldhase und Schaf. Berl Münch Tierärztl Wschr. 1997;110:176-7.

Wuthe HH, Aleksic S, Kwapil S. *Yersinia* in the European brown hare of northern Germany. Contrib Microbiol Immunol. 1995;13:51-4.

Wuthe HH, Schulz-Lell G, Bohlck I, Aleksic S. Ergebnisse von kulturellen Untersuchungen auf *Yersinia enterocolitica* in Proben von Menschen und Schweinen in Schleswig-Holstein. Berl Münch Tierärztl Wschr. 1982;95:288-92.

Young CR, Harvey R, Anderson R, Nisbet D, Stanker LH. Enteric colonisation following natural exposure to *Campylobacter* in pigs. Res Vet Sci. 2000;68:75-8.

Zhang L, Radziejewska-Lebrecht J, Krajewska-Pietrasi D, Toivanen P, Surni M. Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. Mol Microbiol. 1997;29:69-76.

Ziprin RL, Young CR, Stanker LH, Hume ME, Konkel ME. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. Avian Dis. 1999;43:586-9.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname:	Kasimir, Sandra
Geburtsdatum, -ort:	15. Februar 1977, Greiz
Eltern:	Herbert Kasimir <u>Gisela</u> Hildegard Kasimir, geb. Fleischer
Familienstand:	ledig
Kinder:	keine
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildungsweg

09/1983-08/1991	Polytechnische Oberschule „Hermann Matern“ in Greiz
09/1991-06/1995	1. Staatliches Gymnasium Greiz, Abschluss: Abitur
10/1996-01/2002	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig, Abschluss: Staatsexamen
02/2002	Approbation als Tierärztin

Berufliche Tätigkeiten

02/2002-07/2004	Doktorandin am Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig
-----------------	--

10 Anhang

Verwendete Geräte und Reagenzien

Material zur Probenentnahme und –aufbereitung

- Ohrmarken (Fa. Horn-Tierzuchtgeräte, Prima Flex Ohrmarken, Art.-Nr. D600)
- Ohrmarkenzange (Fa. Horn-Tierzuchtgeräte, Prima Flex Ohrmarkenzange, Art.-Nr. D610)
- Reagenzröhrchen, 10 ml, steril
- Wattetupfer, steril
- Schraubdeckelgefäße 100 ml, steril
- Stomacherbeutel (Fa. Transia, Art.-Nr. 85001)
- Verschlusssystem Bagclips (Fa. Transia, Art.-Nr. 85006)
- Kühlakkus
- Kühlbox
- Scheren
- Pinzetten
- Gasbrenner
- Laborwaage (Fa. Satorius, Typ BP 1200)
- Stomacher (Fa. Seward, Typ Stomacher 400)
- Einwegeplastikgefäße

Material zur Kultivierung und Identifizierung

Geräte

- Abflammkarussell (Fa. Tecnomara, Typ Rondoflame)
- Pipetten 100µl-10 ml (Fa. Labsystems, Typ Finnipette)
- Pipettenspitzen (Fa. Eppendorf)
- Anaerobentöpfe (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.16387.0001)
- Anaerocult C (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.16275.0001)
- Brutschränke (Fa. Memmert, Typ BE 600)
- Roti-Store Cryoröhrchen (Fa. Roth, Art.-Nr. P730.1)

Nährmedien, Lösungen, Chemikalien

- CIN-Agar (Fa. Oxoid, Art.-Nr. CM 653)
- *Yersinia* Selective Supplement (Oxoid, Art.-Nr. SR 109E)
- ITC-Broth (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.16723)
- ITC Selektiv Supplement (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.16725.0001)
- Bolton Broth (Fa. Oxoid, Art.-Nr. CM 983)
- Bolton Broth Selective Supplement (Fa. Oxoid, Art.-Nr. SR183 E)
- Horse Blood (Fa. Oxoid, Art.-Nr. SR 48)

- *Campylobacter* Blood-free Selective Agar Base (Fa. Oxoid, Art.-Nr. CM 739)
- CCDA Selective Supplement (Fa. Oxoid, Art.-Nr. SR 155 E)
- Mueller-Hinton-Agar (Fa. SIFIN, Art.-Nr. TN1162)
- Monospezifisches Testsera „Anti-*Yersinia enterocolitica*“ O:3, O:5, O:9 (Fa. SIFIN, Art.-Nr. TS 1701, TS 1704 und TS 1703)
- Nitrat Bouillon (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.10204)
- Nitratreagenz Lösung A
 - 0,25g α -Naphthol in 50 ml 5n Essigsäure
- Nitratreagenz Lösung B
 - 0,4g Sulfanilsäure in 50 ml 5n Essigsäure
- Tryptonwasser (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.10859.0500)
- Kovács-Indolreagenz (Fa. Merck, Art.-Nr. 1,09293.0100)
- Tween-Esterase-Agar
 - 14 g Nutrient Agar Bacto[®] (Fa. Difco, Art.-Nr. 213000)
 - Aqua dest. ad 500 ml
 - 5 ml Tween 80 (Fa. Merck, Art.-Nr. 822187)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), Stammlösung
 - NaCl 85,0g
 - Na₂HPO₄ (x 2H₂O) 14,8g
 - KH₂PO₄ 3,45g
 - Aqua bidest. ad 1l

-diese Stammlösung 1:10 verdünnt ergibt die Gebrauchslösung

Molekularbiologische Methoden

DNA-Extraktion

Geräte

- Zentrifuge (Fa. Eppendorf, Typ Minispin Plus)
- Thermomixer (Fa. Eppendorf, Typ Thermomixer compact)
- Vortexer (Fa. IKA Works., Inc., Typ MS2 Minishaker)
- Spektralphotometer (Fa. amersham pharmacia biotech, Typ Gene Quant II)
- Pipetten (Fa. Eppendorf, Typ Research, 2,5-1000 μ l)
- Pipettenspitzen (Fa. Eppendorf)
- M_{ulti}[®]-Reaktionsgefäße 1,7 ml (Fa. Carl Roth GmbH, Art.-Nr. 7110.1)

Lösungen und Chemikalien

- TRIS-EDTA (10mM TRIS-HCl, 1mM EDTA, Aqua bidest., pH 8,0)
- DNA Purification Kit (Fa. amersham pharmacia biotech, GFX[™] Genomic Blood DNA Purification Kit; Art.-Nr. 27-9603-01)
- Proteinase K (Fa. Roth, Art.-Nr. 7528.1)

PCR/AFLP

Geräte

- 48-er Tubeplates (Fa. PeqLab, Thermo-Fast 48 PCR Plates)
- Optical caps (Fa. PeqLab, Optical caps; 8 caps/strips)
- PCR/UV Work Station (Fa. COY, Typ The Cleanspot)
- Thermocycler (Fa. Biometra, Typ Tpersonal)
- Multipipette plus (Fa. Eppendorf, 10-100µl)

Lösungen und Chemikalien

- PCR-Master-Mix (Fa. Abgene, 1.1 x Reddy MixTM PCR Master Mix (1,5mM MgCl₂); Art.-Nr. AB-0575/LD/b)
- Aqua bidest.
- Restriktionsenzyme (Fa. New England Biolabs)
- Ligase (T4 DNA Ligase, Fa. Promega)
- Ligasepuffer 10x (Fa. Promega)
- MgCl₂ (Fa. peqLab)
- Primer (Fa. MWG-Biotech-AG)
- NEBuffer 2 (Fa. New England Biolabs)
- Adapter (Fa. MWG-Biotech-AG)
- BSA 100x (Fa. New England Biolabs)

PFGE

Geräte

- Tuberkulinspritzen (1 ml, steril, Fa. neoLab)
- Multi[®]-Reaktionsgefäße 1,7 ml (Fa. Carl Roth GmbH, Art.-Nr. 7110.1)
- Pipetten 10 µl-1000µl (Fa. Eppendorf, Typ Research)
- Pipettenspitzen (Fa. Eppendorf)
- 15 ml Zentrifugenröhrchen aus PS, glasklar (Fa. Spicker)
- 5 ml Zentrifugenröhrchen aus PS, glasklar (Fa. Spicker)
- Zentrifuge (Fa. Haraeus Sepatech, Typ Biofuge 15R)
- Schüttelwasserbad (Fa. Köttermann Labortechnik; Typ 3047)
- Vortexer (Fa. IKA Works. Inc., Typ MS2 Minishaker)
- Laborwaage (Fa. Sartorius, Typ L610)
- Analysenwaage (Fa. Sartorius, Typ AC 210S)
- Parafilm
- Mikrowelle (Fa. Panasonic, Typ NN-K448W)
- Deckgläschen
- Spatel
- Sterile Einwegskalpelle

Nährböden, Lösungen und Chemikalien

- TSA (Fa. Oxoid, Art.-Nr. CM131)
- Mc Farland Standard 5 (Fa. bioMérieux, Art.-Nr. 70900)
- NEBuffer 3 (Fa. New England Biolabs)
- Restriktionsenzym *NotI* (Fa. New England Biolabs)
- BSA 100x (Fa. New England Biolabs)
- PIV-Puffer (pH 7,6)

10mM Tris	0,606g
1M NaCl	29,22g
Aqua dest.	ad 500ml
- Lysis-Lösung (vor Gebrauch frisch ansetzen)

Lysozym-Stammlösung (20mg/ml)	1400µl
Lysis-Puffer	70ml
- Lysis-Puffer (pH7,6)

10mM Tris	0,608g
1M NaCl	29,22g
0,2% Natrium Deoxycholat	1,0g
0,5% Natrium Lauryl Sarkosin	2,5g
Aqua dest.	ad 500ml
- ESP-Lösung

Proteinase K-Stammlösung (2mg/ml)	7ml
ES-Puffer	ad 140ml
- ES-Puffer (pH 8,0)

0,5M EDTA	93,05g
10% Natrium Lauryl Sarkosin	50,0g
Aqua dest.	ad 500ml
- 10x TE-Puffer (pH 7,6)

10mM Tris	0,606g
1mM EDTA	0,186g
Aqua dest.	ad 500 ml
- Pefabloc® SC-Protease Inhibitor (Fa. Carl Roth GmbH, Art.-Nr. A154.1)

25 mg in 1 ml Aqua bidest. lösen (zu 20x50µl alliquotieren und zur Aufbewahrung einfrieren)

50µl mit 4,5ml 1x TE kurz vor Gebrauch mischen

- 5x TBE (pH 8,0)

446 mM Tris	54g
446mM Borsäure	27,5g
10mM EDTA	3,72g
Aqua dest.	ad 1000ml
- Agarose (Fa. BioRad, Pulsed Field Certified Agarose, Art.-Nr. 162-0137)
 (Fa. BioRad, Certified™ Low Melt Agarose, Art.-Nr. 161-3111)

Gelelektrophorese und Färbung (PCR, AFLP, PFGE)

Geräte

- Mikrowelle (Fa. Clatronic)
- Elektrophorese System (Fa. peqLab; Perfect Blue™ Horizontal Mini Electrophoresis System; Model L, Art.-Nr. 40-B2) (für PCR)
- Stromversorgung (Fa. Consort, Electrophoresis Power Supply; Typ E 132 und E 835) (für PCR)
- Elektrophorese System (Fa. amersham pharmacia biotech, Multiphor II Electrophoresis System, Art.-Nr. 18-1018-06) (für AFLP)
- Stromversorgung (Fa. amersham pharmacia biotech, Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, Art.-Nr. 18-1130-05) (für AFLP)
- Kühlvorrichtung (Fa. amersham pharmacia biotech, Multi Temp III Thermostatic Circulator, Art.-Nr. 18-1102-78) (für AFLP)
- Elektrophoresesystem (Fa. amersham pharmacia biotech, Gene Navigator Elektrophorese Kammer, Art.-Nr. 181019-19; Hexagonaler Elektrodenkit, Art.-Nr. 181019-20; Gene Navigator Controller, Art.-Nr. 181026-) (für PFGE)
- Stromversorgung (Fa. amersham pharmacia biotech, Electrophoresis Power Supply EPS 600) (für PFGE)
- Gelträger (Fa. peqLab, Art.-Nr. 40-B2 UVT) (für PCR)
- Kamm (Fa. peqLab, Art.-Nr. 40-B2-20D) (für PCR)
- Pipette 2-20µl (Fa. Eppendorf, Typ Research)
- Pipettenspitzen 20µl (Fa. Eppendorf)

Lösungen und Chemikalien

- Agarose (Fa. peqLab, peqGOLD Agarose, Art.-Nr. 35-1020) (für PCR)
- Agarose (Fa. BioRad, Pulsed Field Certified Agarose, Art.-Nr. 162-0137) (für PFGE)
- TBE-Elektrophoresepuffer (Fa. Roth, rotiphorese 10x TBE-Puffer, Art.-Nr. 3061.1) (mit Aqua bidest auf 1x verdünnt für PCR) (auf 0,5 x verdünnt für PFGE)
- GelStar® nucleic acid gel stain (Fa. BioWhittaker Molecular Applications, Art.-Nr. 1-800-341-1574) (für PCR)
- Ethidiumbromid (Fa. Roth, Art.-Nr. 2218.1) (für PFGE)
- Excel Gel® DNA Analysis Kit (Fa. amersham pharmacia biotech, Art.-Nr. 17-11198-07) (für AFLP)

- DNA Silver Staining Kit (Fa. amersham pharmacia biotech, Art.-Nr. 17-6000-30) (für AFLP)
- Längenstandard (Fa. peqLab, peqGOLD DNA-SIZER XII, Art.-Nr. 25-2160) (für PCR/AFLP)
- Längenstandard (λ -Ladder PFG Marker, Fa. New England BioLabs) (für PFGE)
- Ladepuffer 6x (Fa. peqLab) (für PCR)
- Paraffin (für AFLP)

Dokumentation und Auswertung

- Geldokumentation (Fa. Alpha Innotech Corporation, MultiImageTM Light Cabinet) (für PCR/AFLP)
- Geldokumentation (Fa. Alpha Innotech Corporation, ChemiImagerTM Low Light Imaging) (für PCR/AFLP)
- Dokumentationssoftware (Fa. Alpha innotech, alpha ease software) (für PCR/AFLP)
- Drucker (Fa. Sony, digital Graphic Printer UP-D890) (für PCR)
- Auswertungssoftware (Fa. Nonlinear Dynamics, PhoretixTM 1D Advanced Version 5.00 und PhoretixTM 1D Database Version 1.13) (für AFLP/PFGE)
- Geldokumentation (Fa. Biorad, Gel Doc 1000 Video GeldocumentationSystem) (für PFGE)
- UV Transluminator Workstation (Fa. Biorad) (für PFGE)
- Dokumentationssoftware (Multianalyst[®]/ PC Version 1.1) (für PFGE)

Danksagung

Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.

(Marcus Tullius Cicero)

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Professor Dr. Karsten Fehlhaber für die Bereitstellung und Betreuung des wissenschaftlichen Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.
- Herrn Dr. Thomas Alter und Herrn Dr. Michael Gürtler, dass ihr mit mir die zweieinhalb Jahre durch dick und dünn gegangen seit, egal ob im Schweinestall, im Labor oder bei einer Flasche Bier.
- Natürlich danke ich auch Heike Schulzig, Noelia Fernandez-Castro und Nicole Palinsky und schon wieder Micha für die Hilfe im Labor nach den Schlachthofausflügen. Danke, dass ihr mich nicht allein auf meinen „Probenbergen“ habt sitzen lassen!
- Vielen Dank auch an Yvonne Lenk für die zuverlässige und kompetente Mithilfe beim Ausstreichen, DNA-Extrahieren, PCRs pipettieren...
- Für die Unterstützung bei der statistischen Beurteilung der Daten möchte ich mich herzlich bei Herrn Andreas Richter bedanken.
- Allen Angehörigen des Instituts für Lebensmittelhygiene für die ständige Unterstützung jeglicher Art.
- Herzlichen Dank auch nach München, besonders an Frau Dr. Maria Fredriksson-Ahomaa für das Ermöglichen der PFGE und für das geduldige Beantworten meiner Fragen. Ebenso danke ich auch Dr. Christiane Klemm für die technische Unterstützung bei der Durchführung der PFGE und Dr. Michael Bucher, der stets ein offenes Ohr für mich hatte.
- Meinen herzlichsten Dank auch an Dr. habil. Heinrich Neubauer für die Bereitstellung von Stämmen und bei der Hilfe der Beseitigung meiner „Startschwierigkeiten“. Danke auch an Csilla Lodri und Robert Schneider für die praktische Einführung in die Yersiniendiagnostik.
- Vielen Dank ebenso an die Kooperationspartner in dem Projekt, vor allem an Sven Kurze und Mechthild Linnebur für die gute Zusammenarbeit.
- Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern danken, die mir stets zur Seite standen. Des Weiteren danke ich auch meinem Bruder Thomas, der mir in München stets Obdach gewährte und sein leckeres Augustiner mit mir teilte.
- Herzlichen Dank auch an meinen Freund Andreas, der meine manchmal etwas schlechteren Launen nach fehlgeschlagenen Versuchen und meinen Schweinestallgeruch ertragen musste und der geduldig meine Rechtschreibfehler korrigierte.